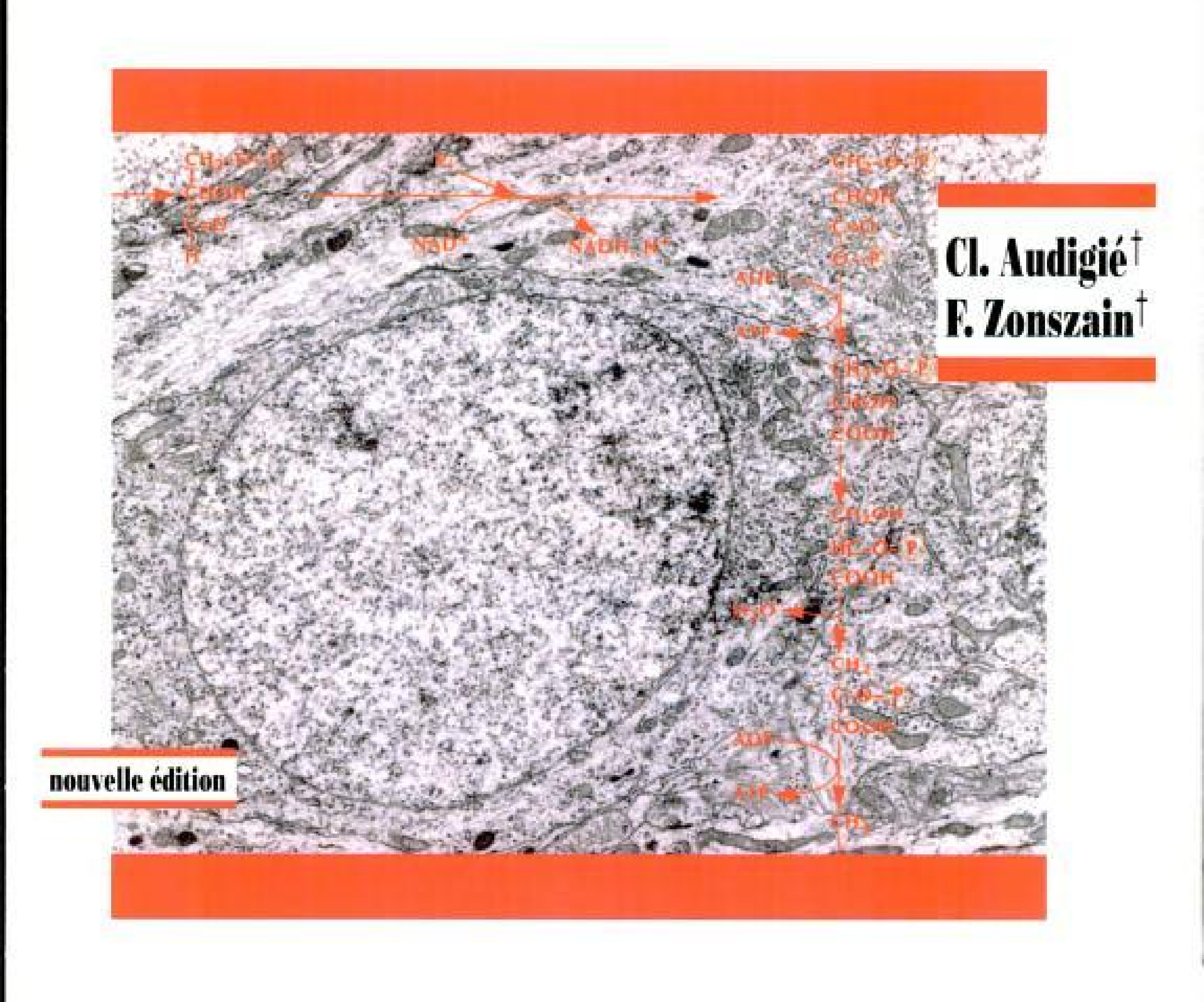
BIOSCIENCES ET TECHNIQUES
collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Biochimie métabolique



Cl. Audigié†
F. Zonszain†

nouvelle édition

doin


Hidden page

Chez le même éditeur

Analyses biologiques, sujets de BTS corrigés
J. Allay, M. Charrin, C. Plas, M. Rivière, P. Vanneste, S. Vanneste

Biochimie structurale
Cl. Audigié, F. Zonszain

Principes des méthodes d'analyse biochimique
Cl. Audigié, G. Dupont, F. Zonszain
Tome 1, 2[e] édition
Tome 2, 2[e] édition

Exercices de biochimie
F. Lafont, C. Plas, P. Cazaubon, 2[e] édition

Biotechnologies. Principes et méthodes
M. Larpent-Gourgaud, J.-J. Sanglier

Génie enzymatique. Travaux pratiques
D. Loncle

Génie génétique
D. Loncle, M. Amaudric, C. Jacoty

Manipulations d'analyse biochimique
M. Gavrilovic, M.-J. Maginot, Cl. Schwartz-Gavrilovic, J. Wallach
3[e] édition revue et corrigée

Précis de physiologie
A. Calas, J.-F. Perrin, C. Plas, P. Vanneste

Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques
R. Perrier, T. Auffret van der Kemp, F. Zonszain

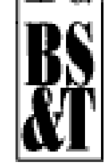
Éléments de biologie cellulaire
D. Robert, B. Vian, 3[e] édition, 2004

Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés
A. Meyer, J. Deiana, A. Bernard, 2[e] édition, 2004

Microbiologie et toxicologie des aliments
G. Leyral, E. Vierling

Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires
G. Bonnefoy, F. Guillet, G. Leyral, F. Verne

Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique
G. Coulouly, E. Klein, E. Barbieri, M. Kriat



BIOSCIENCES ET TECHNIQUES
collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Biochimie métabolique

Claude Audigié †
Inspecteur général de l'Éducation nationale
François Zonszain †
Professeur agrégé à l'École nationale de Chimie, Physique et Biologie

doin éditeurs

DOIN ÉDITEURS
1, rue Eugène et Armand Peugeot
92856 Rueil-Malmaison Cedex

ISBN 2-7040-0715-2

1995, 3e édition revue et corrigée

Imprimé en France

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 1 *GÉNÉRALITÉS SUR LE MÉTABOLISME*

Chapitre 2 *L'ÉNERGIE DANS LES RÉACTIONS BIOCHIMIQUES*

Chapitre 3 *LA CATALYSE BIOCHIMIQUE : LES ENZYMES*

Chapitre 4 *LA CHAÎNE RESPIRATOIRE : TRANSFERT D'ÉLECTRONS ET PHOSPHORYLATION OXYDATIVE*

Chapitre 5 *LE CYCLE DES ACIDES CARBOXYLIQUES OU CYCLE DE KREBS*

Chapitre 6 *LE MÉTABOLISME GLUCIDIQUE*

Chapitre 7 *LE MÉTABOLISME DES LIPIDES*

Chapitre 8 *LE MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS*

Chapitre 9 *LE MÉTABOLISME DES NUCLÉOTIDES*

Chapitre 10 *BIOSYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES RÉPLICATION ET TRANSCRIPTION*

Chapitre 11 *LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE, LA TRADUCTION*

1

Généralités sur le métabolisme

I. LE MÉTABOLISME : ANABOLISME ET CATABOLISME

La biochimie dynamique a pour but d'étudier, à l'échelle moléculaire, l'ensemble des transformations se déroulant au sein de la matière vivante. Chaque être vivant, quel que soit son niveau d'organisation, est en effet le siège d'une activité continuelle qui se traduit par des échanges permanents de matière et d'énergie avec le milieu dans lequel il vit. Ainsi tout organisme puise dans son milieu environnant les matériaux qui lui sont nécessaires : eau, sels minéraux, éventuellement substances organiques, oxygène, dioxyde de carbone, etc. Ce sont ses « aliments » qu'il transforme :

— d'une part pour élaborer de la matière vivante (cytoplasme et inclusions) et de la matière inerte (réserve et déchets),

— d'autre part pour produire certaines formes d'énergie (énergie calorifique, énergie mécanique, énergie électrique, etc.).

Par définition le métabolisme est l'ensemble des transformations de matière et des échanges d'énergie dont l'être vivant est le siège. Il comporte deux phases concomittantes et inverses : *l'anabolisme et le catabolisme.*

A. L'anabolisme ou assimilation

Il correspond à la synthèse de matière vivante et de substances de réserve, c'est-à-dire à l'élaboration de molécules complexes à partir d'éléments ou de molécules simples. Cette phase nécessite un apport énergétique suffisant.

B. Le catabolisme ou dégradation

C'est une destruction de molécules complexes dont il résulte la formation de déchets et une production plus ou moins importante d'énergie.

Ex. : La dégradation du glycogène musculaire en acide lactique CH_3—CHOH—COOH et son oxydation en dioxyde de carbone et eau, lors d'une contraction, s'accompagnent d'une libération d'énergie calorifique et parfois d'un travail ; c'est du catabolisme. La resynthèse hépatique de glycogène à partir de

l'acide lactique musculaire transporté par le sang représente de l'anabolisme. Ces deux phénomènes constituent une partie du métabolisme glucidique de l'organisme (fig. 1.1).

Dans cet exemple les deux phases ont lieu dans des organes différents mais elles peuvent évoluer également au sein de la même cellule.

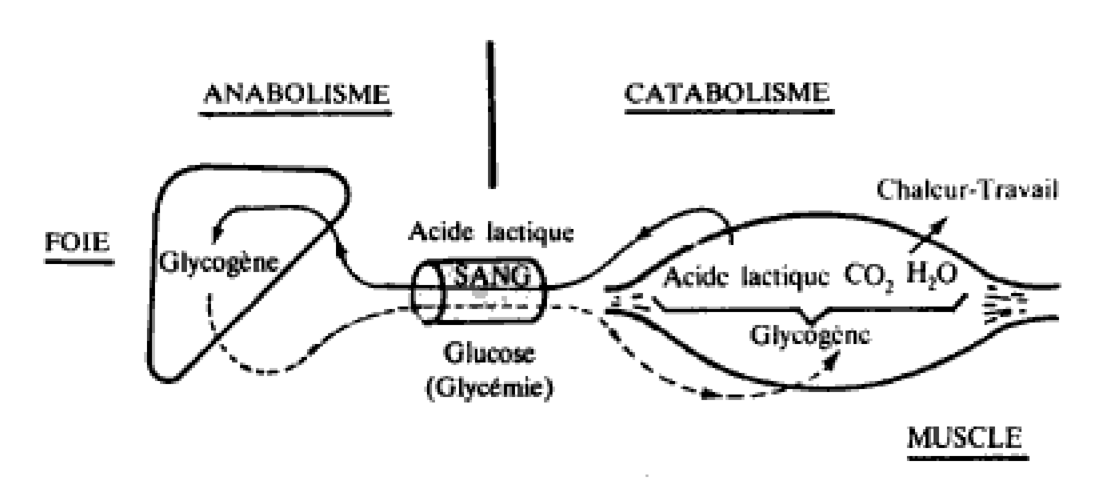


Figure 1.1 Notion d'anabolisme et de catabolisme (Cycle de Cori).

II. L'AUTOTROPHIE ET L'HÉTÉROTROPHIE

Si les processus du catabolisme sont sensiblement analogues chez tous les êtres vivants, il n'en est pas de même pour l'anabolisme.

Certains organismes peuvent réaliser la synthèse de tous leurs constituants uniquement à partir de composés minéraux, mais une source d'énergie leur est absolument indispensable. Ces organismes dits ***autotrophes*** sont capables, par la mise en jeu de mécanismes chimiques qui leur sont propres, d'introduire à certains stades de leur métabolisme un apport d'énergie extérieure, énergie chimique ou énergie lumineuse. C'est par l'intermédiaire de ces organismes autotrophes que l'énergie et le carbone pénètrent dans la biosphère.

Selon la forme de l'énergie mise en jeu on distingue :

- **Les autotrophes par photosynthèse** (encore appelés *phototrophes*) qui utilisent l'énergie de certaines radiations lumineuses par l'intermédiaire de leurs pigments chlorophylliens ;

- **Les autotrophes par chimiosynthèse** (encore appelés *chimiolithotrophes*) chez lesquels l'énergie provient de réactions d'oxydation portant sur des composés minéraux, dérivés de l'azote et du soufre en particulier (NO_2^-, NH_3, HS^-, $S_2O_3^{2-}$, etc.).

L'énergie extérieure ainsi capturée par les autotrophes est emmagasinée au cours de l'anabolisme sous forme d'énergie chimique dans les glucides en particulier. Elle sera libérée et éventuellement utilisée au cours des réactions du catabolisme réalisées par tous les organismes vivants.

— Les autres organismes ont un besoin absolu de substances organiques diverses fournissant à la fois la matière et l'énergie : ce sont des ***hétérotrophes*** (ou *chimio-organotrophes*). Ces derniers sont en effet incapables de capturer et d'utiliser l'énergie lumineuse ou l'énergie des molécules inorganiques simples. Ils sont donc tributaires de la fourniture en glucides synthétisés par les autotrophes. Chez les hétérotrophes l'énergie nécessaire aux synthèses provient uniquement de l'oxydation des substances organiques au cours des phénomènes de la respiration et des fermentations. Selon les cas, les réactions d'oxydoréduction exigent la présence d'oxygène (aérobies stricts) ou au contraire son absence (anaérobies stricts). Dans de nombreux cas les deux possibilités peuvent être utilisées (aérobies facultatifs ou aéro-anaérobies).

En fait cette répartition est schématique car il existe des degrés aussi bien dans l'autotrophie que dans l'hétérotrophie et les formes d'énergie utilisées ne sont pas toujours aussi nettement tranchées.

— L'une des conséquences de cette répartition des organismes est l'existence d'une circulation continue de matière et d'énergie dans le monde biologique.

La circulation de matière s'effectue sous forme d'un cycle entre les autotrophes (végétaux chlorophylliens, certaines bactéries) et les hétérotrophes (animaux, bactéries, etc.).

La circulation d'énergie s'effectue au contraire sous forme d'un courant irréversible lié en quelque sorte à une dégradation de l'énergie : énergie solaire nucléaire, énergie rayonnante, énergie chimique des autotrophes, autres formes d'énergie et finalement chaleur.

— Chez les hétérotrophes, les substances organiques nécessaires ne sont généralement pas présentes dans le milieu sous une forme directement utilisable par les cellules. Le premier temps du métabolisme consiste alors en une série de transformations, essentiellement chimiques, qui ont pour résultat d'amener ces substances à l'état de molécules relativement petites, solubles, diffusibles et ayant perdu tout caractère spécifique en rapport avec leur origine. Cette transformation des aliments en nutriments est typiquement extracellulaire. Elle se produit soit à l'extérieur des cellules (milieu extérieur ou tube digestif) soit à l'intérieur de « petits sacs imperméables » inclus dans le cytoplasme, les vacuoles digestives. Dans tous les cas cette phase de digestion consiste en une série d'hydrolyses catalysées enzymatiquement. Après absorption, les nutriments ainsi formés subissent alors une série de transformations chimiques intracellulaires que l'on englobe sous le terme de métabolisme intermédiaire (fig. 1.2).

Le ***métabolisme intermédiaire*** représente donc un ensemble complexe de réactions chimiques réalisées sous la dépendance de catalyseurs : les ***enzymes*** et qui portent sur d'autres molécules ; les ***substrats.***

III. L'ÉQUILIBRE DYNAMIQUE

Pour une cellule — et pour un organisme pluricellulaire —, anabolisme et catabolisme sont équivalents à deux flux matériels et énergétiques opposés.

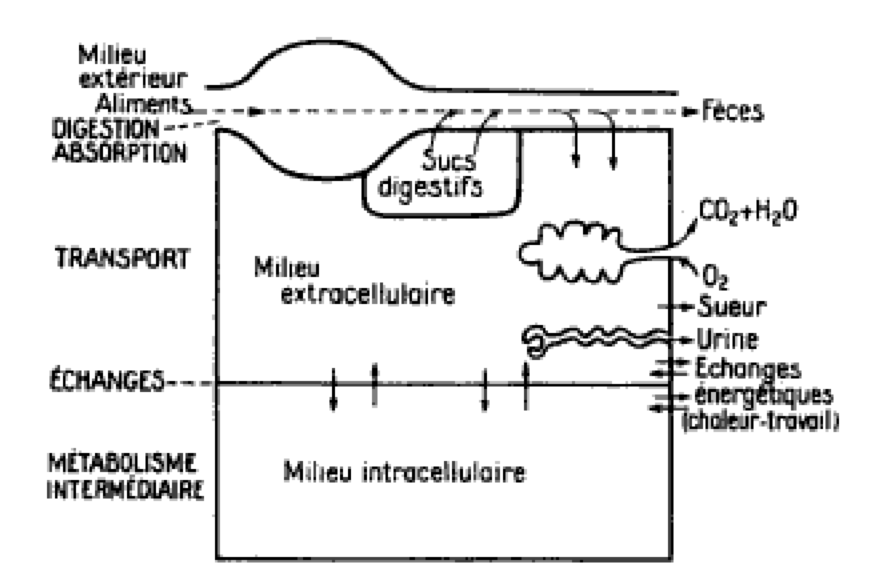


Figure 1.2 Schéma des échanges de l'organisme humain.

Leur somme algébrique, qui n'est autre qu'un bilan, peut être positive, négative ou nulle, l'anabolisme étant dans ce calcul affecté du signe +. A chacune des valeurs de ce bilan sont liés des états physiologiques différents.

Un bilan positif correspond soit à une croissance véritable (accroissement du matériel cellulaire et différenciation), soit à une surcharge en substances de réserves. Il peut conduire dans certains cas à une croissance en nombre ou multiplication.

Un bilan négatif représente une dénutrition plus ou moins grave et généralisée.

Un bilan nul, qui est un état physiologique normal pour un organisme adulte, ne signifie pas l'arrêt des transformations. En effet, chaque cellule est un système ouvert, c'est-à-dire échangeant à la fois matière et énergie, qui peut atteindre un état stable dont les caractéristiques restent constantes, indépendamment du temps. Il en résulte que cet état stationnaire, hautement ordonné, qui est improbable au point de vue thermodynamique, ne peut se maintenir qu'en assurant en permanence le maintien de cet ordre ; ce qui nécessite des transformations continuelles. L'état d'équilibre n'est qu'apparent, il est la conséquence d'un *renouvellement permanent* ou « ***Turn-over*** » et l'on parle pour cette raison d'équilibre dynamique.

Le renouvellement permanent, mis en évidence et étudié grâce à l'emploi des isotopes radio-actifs, est général (fig. 1.3). Il concerne les différents groupes de constituants cellulaires (substances minérales, lipides, glucides, protides, etc.) et les différentes structures (tissus, protéines cellulaires et circulantes, réserves, enzymes, etc.). Son importance est variable et pour le caractériser on a défini une vitesse de renouvellement et un temps de demi-vie biologique en état stationnaire.

La *vitesse de renouvellement* ou « *Turn-over rate* » est le pourcentage de substance renouvelée par unité de temps et le *temps de demi-vie biologique* ou *demi-durée de vie biologique* est le temps nécessaire pour le renouvellement de la moitié de la substance présente.

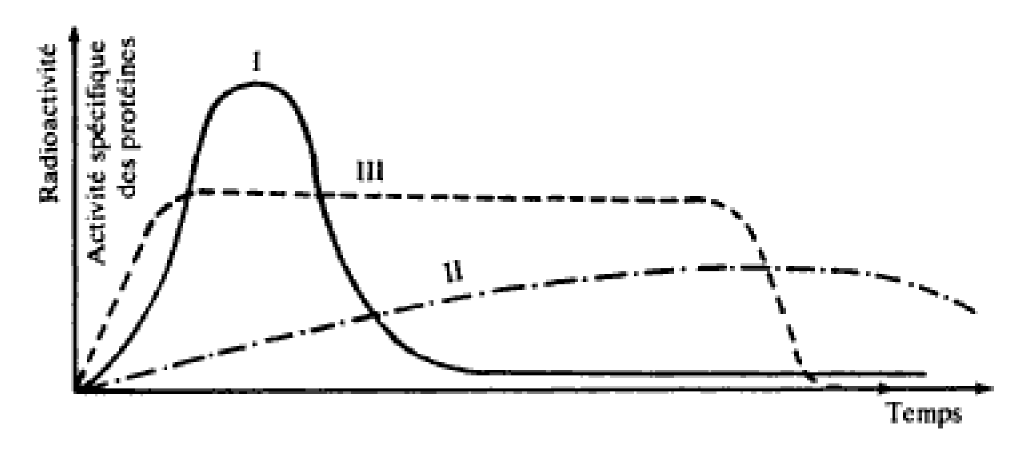


Figure 1.3 Evolution de la radio-activité protéique après administration d'une dose unique d'amino-acide marqué. I. : Turn-over rapide (foie, rein) ; II. : Turn-over lent (muscle, peau) ; III. : durée de vie protéique limitée à celle de la cellule (leucocyte).

Les résultats sont très variables, en rapport avec l'activité du métabolisme en équilibre dynamique ; de plus, les mesures sont entachées d'une incertitude importante due à la technique et aux nombreux paramètres influençant le résultat.

Ex. : En nous limitant aux protéines humaines, les résultats du tableau 1.1 ci-dessous correspondent à des courbes analogues à celles de la figure 1.3.

Tableau 1.1 Renouvellement des protéines humaines (valeurs arrondies).

	Vitesse de renouvellement (% par 24 h)	Demi-durée de vie (en jours)
Protéines totales	0,009	80
Protéines :		
hépatiques et sériques	0,07	10
sérum-albumine	0,05	15 (7 à 28)
γ-globulines	0,05	13 (4 à 21)
Protéines musculaires	0,0045	160

Le renouvellement cellulaire permanent n'est autre que la résultante des processus simultanés de synthèse et de dégradation (flèches 1 et 2 de la fig. 1.4) dont les variations des uns par rapport aux autres ont pour conséquence la croissance ou la dénutrition. Il détermine l'importance des échanges cellulaires (absorption, excrétion) en admettant que le milieu extérieur n'est pas le facteur limitant.

IV. LE MILIEU RÉACTIONNEL

Le milieu dans lequel s'effectuent les réactions chimiques du métabolisme n'est autre que le milieu cellulaire, le cytoplasme et ses inclusions, le noyau. Un

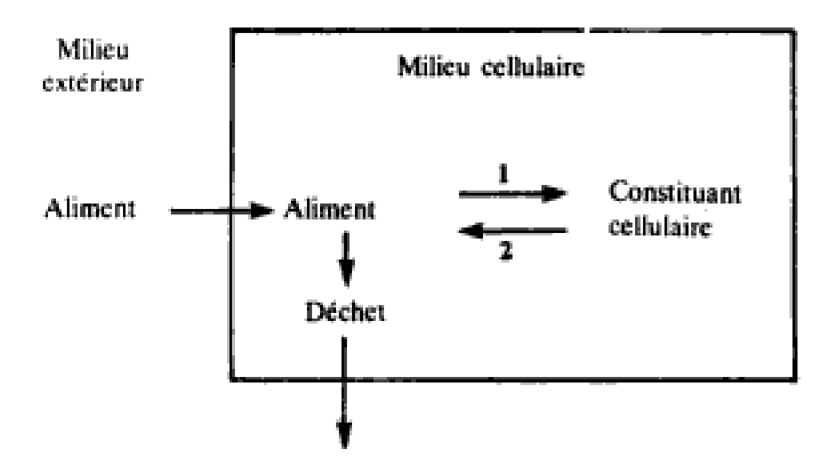


Figure 1.4 Schéma des transformations matérielles du métabolisme (d'après Trémolières).

examen superficiel pourrait faire penser que la matière vivante, par ses propriétés particulières, a des possibilités réactionnelles très limitées. En fait il n'en est rien et il est remarquable qu'aucune, ou presque, des innombrables réactions biochimiques ne puisse se produire spontanément en dehors de la cellule dans les conditions de température, de pH et de pression du milieu vivant. Cette particularité est indispensable au maintien de la vie cellulaire, elle lui permet d'échapper aux fluctuations du milieu extérieur et de conserver sa structure et son fonctionnement grâce à un ensemble de régulations.

Examinons de plus près quelques-unes de ces propriétés particulières à la matière vivante.

— Les réactions biochimiques se déroulent essentiellement en *milieu aqueux*. Par suite de sa teneur élevée en eau, la matière vivante paraît très défavorisée pour accomplir ses réactions de biosynthèse qui correspondent le plus souvent à une condensation avec élimination d'eau : formation des liaisons osidiques, peptidiques, esters par exemple. En fait, ces réactions sont catalysées par des enzymes protéiques et la connaissance de la structure spatiale des protéines a mis en évidence à l'intérieur de ces molécules des zones non polaires et non aqueuses où peuvent avoir lieu des réactions dans des conditions particulières de milieu. Ces zones interviendraient un peu comme les solvants organiques des chimistes, en modifiant les propriétés de l'environnement ; abaissement de la constante diélectrique ayant une influence sur la dissociation et sur la réactivité des liaisons.

— La *température* et la *pression* sont sensiblement constantes, les réactions biochimiques sont avant tout des réactions isothermes à pression constante. Si pour les réactions en solution, la pression est peu importante, la chaleur au contraire est une forme d'énergie fondamentale en chimie. Nous verrons, que dans le monde vivant, c'est une autre forme d'énergie qui intervient.

— La *concentration* de la plupart des « réactifs » ne varie que dans de très faibles proportions. Ainsi, le pH, la pression partielle en oxygène, les concentrations des substrats sont sensiblement constants. Il ne s'agit là encore que d'un équilibre dynamique masquant des transformations continuelles et une réaction chimique équilibrée peut évoluer de façon permanente par suite de la disparition de l'un des composés ou de la formation de l'autre.

Ex. : L'équilibre chimique :

dihydroxyacétone phosphate ⇄ glycéraldéhyde-3-phosphate

correspond à 96 % du premier pour 4 % du second. Dans l'organisme il est déplacé en permanence car seul le glycéraldéhyde-3-phosphate subit la suite du catabolisme. La réaction équilibrée tend à devenir totale, l'équilibre au sens chimique ne peut se réaliser.

— L'*agitation* et les *catalyseurs chimiques* font défaut dans la matière vivante. En premier lieu, les catalyseurs sont remplacés dans la cellule par des substances protéiques beaucoup plus actives, les ***enzymes***. En second lieu l'agitation qui favorise le hasard des rencontres entre les molécules réagissantes n'est pas nécessaire. Par sa *structure*, la cellule réduit les effets du hasard : les nombreuses formations membranaires offrent des surfaces de contact et des interfaces considérables, l'équilibre dynamique assure un renouvellement constant, les molécules actives sont localisées et orientées de façon précise. En un mot le milieu cellulaire n'est pas homogène mais architecturé (fig. 1.5).

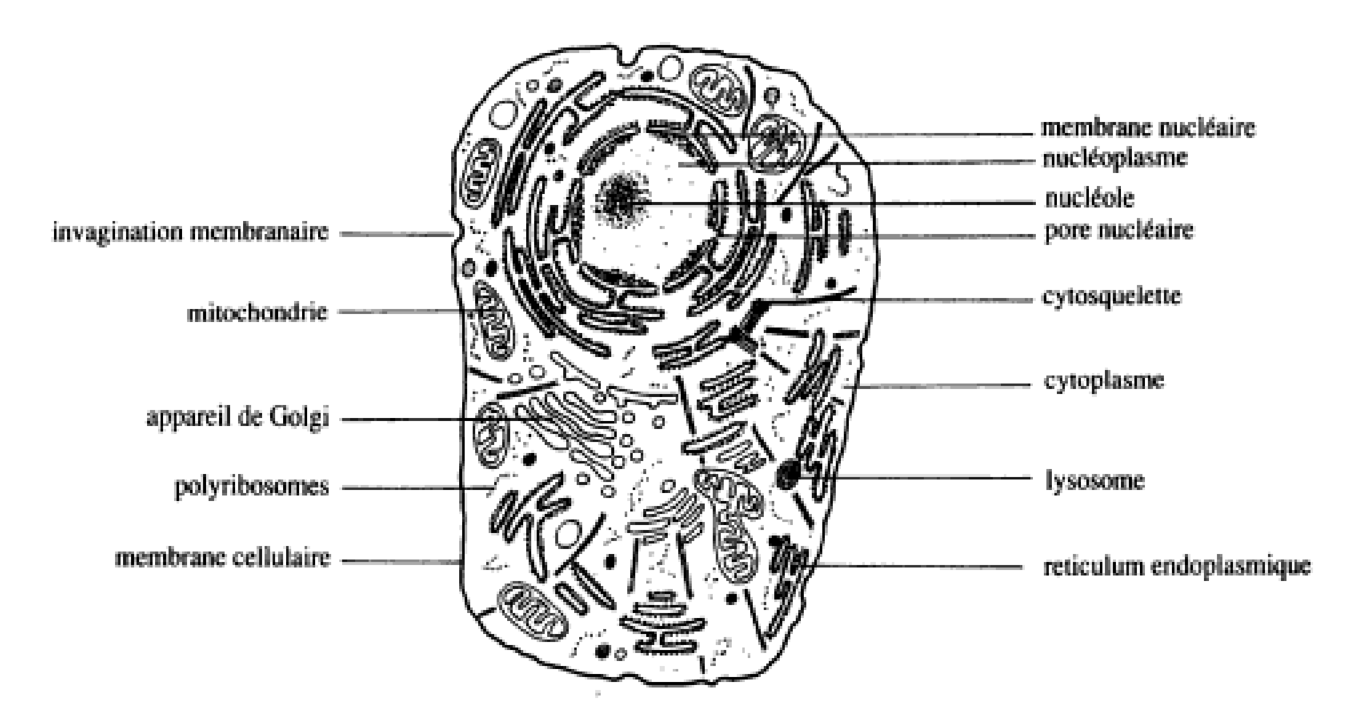


Figure 1.5 Structure schématique d'une cellule animale.

— Enfin les espèces moléculaires présentes sont nombreuses et variées, beaucoup d'entre elles possédant une structure électronique particulière qui leur confère une stabilité et une réactivité remarquables : ce sont des molécules fortement conjuguées.

L'ensemble de ces facteurs permet l'accomplissement d'une multitude de réactions métaboliques à l'intérieur d'une même cellule tout en conservant des possibilités de contrôle et d'intégration par de multiples régulations. L'importance de ces phénomènes est considérable, en particulier dans les cellules à croissance rapide. Ainsi une cellule bactérienne comme E. coli placée dans des conditions favorables

synthétise environ 12.500 molécules de lipides par seconde ; plus de 1.000 molécules de protéines cellulaires par seconde à partir des acides aminés constitutifs. Chaque molécule protéique nécessitant la formation de plusieurs centaines de liaisons peptidiques.

Même en état d'équilibre dynamique la cellule conserve un métabolisme intermédiaire très actif. La cellule hépatique du rat par exemple dont la durée de vie est de deux à trois mois, renouvelle la moitié de son glycogène en moins de six heures, la moitié de ses protéines en dix jours et la moitié de l'ADN du noyau en deux mois environ. Les organites eux-mêmes ont une demi-durée de vie ou période, relativement brève, dix jours pour les mitochondries dans cet exemple.

V. MÉTHODES D'ÉTUDE DU MÉTABOLISME

Les nombreuses méthodes, de principes très différents, qui ont permis d'établir les conceptions actuelles du métabolisme, ont dû surmonter deux grandes difficultés : la faible quantité et la labilité de la plupart des constituants biochimiques ainsi que l'état d'organisation de la cellule et surtout des êtres pluricellulaires.

La première difficulté a été surmontée par les progrès des techniques analytiques, la seconde par la confrontation des résultats obtenus à partir d'unités d'organisations diverses : organismes, organes, tissus, cellules, fractions subcellulaires, enzymes purifiés. L'étude des principales techniques de préparation du matériel et de mesure relève de la biochimie analytique.

L'étude du métabolisme revêt divers aspects :

— **L'établissement de la séquence de la voie métabolique.** Une voie métabolique est un système constitué de plusieurs réactions enzymatiques enchaînées, le produit de l'une étant le substrat de la suivante. Chacune des réactions est catalysée par une enzyme particulière.

$$\text{Précurseur de la chaîne} \rightarrow A \underset{E_{AB}}{\rightarrow} B \underset{E_{BC}}{\rightarrow} C \underset{E_{CD}}{\rightarrow} D \underset{E_{DE}}{\rightarrow} E \underset{E_{EF}}{\rightarrow} F \leftarrow \text{Métabolite final}$$

Enzymes

— **La localisation de cette voie** dans l'un des compartiments cellulaires : cytosol, mitochondrie, reticulum endoplasmique, etc.

— **L'étude des mécanismes de régulation.** Le fonctionnement d'une voie métabolique est conditionné par les besoins et le mode de vie des cellules, il existe des mécanismes de régulation qui modulent son activité de façon harmonieuse et économique.

2

L'énergie dans les réactions biochimiques

Les manifestations énergétiques de la physiologie cellulaire sont variées, production de chaleur, synthèse de composés chimiques, mouvements, phénomènes osmotiques, électriques, etc. Certaines sont générales comme la synthèse chimique et la production calorifique, d'autres sont particulières à quelques types cellulaires comme le mouvement ou l'utilisation de l'énergie lumineuse.

En ce qui concerne les réactions chimiques du métabolisme, deux formes d'énergie sont quantitativement importantes, ce sont :

— l'*énergie chimique,* utilisée par tous les organismes vivants et dont la conversion s'accompagne toujours d'une production d'*énergie calorifique* plus ou moins importante ;

— l'*énergie de certaines radiations lumineuses,* utilisable seulement par les êtres vivants autotrophes pourvus de chlorophylle qui la convertissent en énergie chimique (glucides, lipides, protides) à partir de molécules minérales simples (dioxyde de carbone, eau, nitrates, etc.).

Si les diverses formes de l'énergie peuvent se transformer les unes dans les autres suivant certaines règles, et si de plus, la disparition d'énergie sous une certaine forme entraîne l'apparition d'une quantité équivalente sous d'autres formes (principe de l'équivalence des différentes formes de l'énergie), il n'en demeure pas moins que ces différentes formes ne sont pas équivalentes en tout point pour un organisme. Ainsi l'énergie chimique est toujours convertible en énergie thermique, et la conversion peut être totale, alors que la réciproque n'est pas possible.

Les organismes sont incapables de réaliser la transformation de l'énergie thermique en énergie chimique, ils n'utilisent pas la chaleur ; l'énergie chimique représente pour la matière vivante le pivot des transformations énergétiques.

L'étude des lois d'échanges et de transformations de l'énergie dans l'organisme vivant constitue la « bioénergétique ». C'est l'application aux réactions biochimiques des principes thermodynamiques établis à propos de l'étude des machines thermiques.

I. NOTIONS PRÉLIMINAIRES

Les principes thermodynamiques postulent que chaque événement physique ou chimique qui peut affecter un système, c'est-à-dire une partie finie du monde

matériel, est réglé par le contenu d'énergie de ce système et par l'échange d'énergie entre ce système et le reste de l'univers ou extérieur.

D'après le *premier principe,* le contenu d'énergie totale de l'univers reste constant. Il énonce l'équivalence ou la conservation de l'énergie. Si un système subit des transformations le ramenant à son état initial (on dit qu'il décrit un cycle) l'énergie reçue de l'extérieur est nulle. Si W représente le travail (ou énergie mécanique) reçue et Q la chaleur (ou énergie thermique) reçue par le système, la somme $W + Q$ est nulle, $W + Q = 0$ ou $W = -Q$ ou $|W| = |Q|$. Il y a donc équivalence entre l'énergie mécanique (W) et l'énergie thermique (Q). Ces deux grandeurs sont donc exprimées en joules (J).

Au cours d'une transformation non cyclique, la variation d'énergie interne U du système est égale à la somme $W + Q$

$$\Delta U = W + Q$$

W ou Q sont positives si le système reçoit effectivement de l'énergie mécanique ou de l'énergie thermique.

D'après le *second principe,* l'entropie de l'univers ne peut qu'augmenter. Il précise par suite la spontanéité ou la réversibilité d'une transformation puisqu'au cours de celle-ci l'entropie de l'univers (système + extérieur) ne peut qu'augmenter.

A. L'énergie totale d'un système, ses transformations

A partir de l'équation de réaction $H_{2(G)} + 1/2\ O_{2(G)} \rightarrow H_2O_{(Liq)},$ considérons deux états du système hydrogène-oxygène. Un *système* étant défini comme une partie finie du monde matériel, nous pouvons envisager, comme état initial n° 1, le mélange gazeux constitué par 1 mole d'hydrogène et 0,5 mole d'oxygène, sous la pression P et à la température T K et, comme état final n° 2, 1 mole d'eau dans les mêmes conditions de température et de pression.

1. L'ÉNERGIE INTERNE

Chaque état est caractérisé par un certain *niveau énergétique* défini à partir :

— des conditions physiques, température T et pression P ;

— de sa composition C qui précise la nature chimique des constituants et les quantités respectives.

Les niveaux énergétiques des états 1 et 2, symbolisés U_1 et U_2 correspondent à des valeurs définies de la fonction d'état $U = f(C, T, P)$ *appelée* **énergie interne** du système. En réalité, les valeurs U_1 et U_2 ne sont déterminées qu'à une constante *d'addition* près, elles ne peuvent pas se traduire par des valeurs numériques, par contre leur différence $\Delta U = U_2 - U_1$ peut être chiffrée.

Dans chacun des états 1 et 2, l'énergie interne du système est égale à la somme des énergies internes et des énergies cinétiques de toutes les molécules qui le composent.

— L'énergie cinétique de chaque molécule ou énergie de translation dépend de la température et est responsable de la pression exercée par la substance sur les parois du récipient qui la renferme. L'énergie cinétique moyenne est pour une mole de gaz parfait mono-atomique égale à 3/2 RT, R est la constante des gaz parfaits : soit à 25 °C, 8,314 $J.K^{-1}.mol^{-1}$. Cette énergie qui est une conséquence de l'agitation moléculaire peut varier de façon continue.

L'énergie propre de chaque molécule est due :

— au mouvement des atomes qui la constitue.

• **Energie de rotation** E_r par rapport au centre de gravité de la molécule,

• **Energie de vibration** E_v des atomes autour de leur position d'équilibre qui correspond à la « géométrie » de la molécule ;

— au mouvement des électrons dans le champ de potentiel créé par les noyaux des atomes : c'est l'énergie électronique E_e. Cette énergie dépend du modèle moléculaire : nature des atomes, répartition des électrons sur les orbitales.

Contrairement à l'énergie cinétique, les différents termes E_r, E_v, E_e de l'énergie propre de chaque molécule ne peuvent varier que de façon discontinue entre des niveaux énergétiques précis différents les uns des autres de quantités finies d'énergie appelées « quanta » d'énergie.

Le passage de l'état 1 à l'état 2 peut se réaliser de différentes manières, mais dans tous les cas la variation d'énergie interne ΔU *ne dépend que l'état initial et de l'état final.* Le processus suivi dans la transformation, donc les états intermédiaires, n'influencent pas ΔU qui représente la variation d'énergie totale du système dans la transformation $1 \rightarrow 2$:

$$\Delta U = U_2 - U_1 .$$

Pour notre exemple $\Delta U \approx -293$ kJ/mol. Cette variation est négative, car elle correspond à de l'énergie perdue par le système et gagnée par le milieu.

2. L'ENTHALPIE

Examinons maintenant quelques processus possibles pour la transformation $1 \rightarrow 2$.

• La transformation peut être réalisée dans une *bombe calorimétrique* par l'intermédiaire d'une étincelle électrique. Dans ce cas, P et T varient mais le volume V demeure constant et aucun travail n'est produit. ΔU est transformé uniquement en chaleur, soit 293 kJ/mol environ.

• La transformation peut être réalisée dans une *enceinte sous pression constante ;* dans ce cas, P est constante mais V et T varient. Il y a production d'un travail des forces de pression correspondant à $W = -P(V_2 - V_1) = -P\,\Delta V$ qui sera compté négativement puisque fourni au milieu. Dans cette transformation, on aura donc :

$$\Delta U = U_2 - U_1 = Q - P\,\Delta V \quad \text{ou} \quad Q = \Delta U + P\,\Delta V .$$

Pour le processus à pression constante, Q est noté ΔH et porte le nom de variation d'enthalpie. La fonction d'état **enthalpie** $H = U + PV$ présente les mêmes caractéristiques que la fonction énergie interne, toutes deux expriment le contenu énergétique total d'un système, contenu qui se conserve si le système est isolé, n'échangeant ni matière, ni énergie.

Pour une réaction chimique, ΔH n'est autre que la chaleur de réaction à pression constante, symbolisée Q_p par les chimistes. Dans notre exemple $\Delta H = -286$ kJ/mol.

Si $\Delta H > 0$, la réaction est endothermique, de la chaleur est absorbée par le système.

Si $\Delta H < 0$, la réaction est exothermique.

La différence $\Delta H - \Delta U = 7$ kJ/mol correspond au travail des forces de pression $P\,\Delta V$.

La variation d'enthalpie (donc la chaleur de réaction à pression constante) dépend légèrement de la température. Ce phénomène résulte du fait que cette variation d'enthalpie, correspondant à la transformation du système à la température donnée T, peut provenir d'au moins deux sources distinctes : thermique et chimique.

— *La composante chimique* est la chaleur de réaction que l'on mesurerait si la réaction s'effectuait au zéro absolu. Elle est d'origine électronique et représente essentiellement la différence entre les énergies des liaisons dans l'état final et dans l'état initial. Soit pour notre exemple : 1 mole de liaison H-H, 0,5 mole de liaison O═O se transformant en 1 mole de liaisons H-O-H. Elle peut être aisément calculée à partir des énergies de liaisons.

— *La composante thermique* est liée à l'apparition, lors de la transformation, de nouvelles molécules possédant des caractéristiques de translation, de vibration ou de rotation différentes des molécules initiales. Ces caractéristiques dépendent de la température ; l'énergie thermique correspondante augmente quand la température s'élève, elle s'annule au zéro absolu du fait de la disparition des mouvements.

• Le passage de l'état 1 à l'état 2 peut également être réalisé, dans une *pile*, à l'aide d'*électrodes spécifiques* (électrodes gazeuses). Cette fois la transformation peut s'effectuer non seulement à pression constante mais aussi à température constante (transformation isotherme).

Une telle pile réversible a une f.é.m. de 1,23 V et elle débite 96.485 C/mol. L'énergie électrique ainsi fournie est égale à environ – 237 kJ/mol.

Cette valeur correspond à un maximum ; elle représente une évaluation du *travail maximum* que la transformation est susceptible de produire quand elle se réalise dans les meilleures conditions qui, en thermodynamique, sont celles d'un *processus réversible*. Un tel processus qui est un cas limite, imaginaire, est formé par une suite continue d'états d'équilibre, ce qui suppose qu'à tout moment le

changement peut se faire aussi facilement dans un sens que dans l'autre. Une transformation naturelle n'est jamais rigoureusement réversible, mais elle peut en être infiniment voisine, comme c'est le cas dans la pile évoquée ci-dessus, ce qui nécessite l'isothermie, l'absence de frottements... Les processus explosifs sont irréversibles notamment à cause de l'élévation rapide de température qui ne permet des transferts thermiques que du système vers le milieu, mais non l'inverse.

Les variations d'énergie interne ou d'enthalpie sont indépendantes du processus, mais par contre la fraction de cette énergie utilisable pour produire un travail, c'est-à-dire toute forme d'énergie autre que la chaleur, en dépend. Cette fraction est maximum quand le processus est réversible, ce qui nécessite en particulier l'isothermie, condition réalisée chez les être vivants.

B. L'énergie utilisable d'une transformation

Pour préciser cette fraction de l'énergie, il nous faut, au préalable, considérer la notion d'entropie. Le deuxième principe de la thermodynamique, qui préside à la dégradation de l'énergie, permet de définir pour un système une fonction **entropie** S qui, comme U, est définie par l'état du système $S = \varphi(C, T, P)$ et dont la variation dépend de l'état initial et de l'état final $\Delta S = S_2 - S_1$.

Cette fonction mesure le *désordre* de chaque système qui est caractérisé, en plus d'un niveau énergétique U, par un certain degré d'organisation à l'échelle moléculaire, c'est-à-dire par un ordre ou un désordre plus ou moins important, en ayant présent à l'esprit qu'à l'échelle moléculaire, homogénéisation signifie désordre, soit encore probabilité maximum de trouver en un point donné n'importe quelle molécule à n'importe quelle vitesse. A quelques exceptions près, S serait nulle pour un corps cristallisé à 0 K traduisant l'ordre complet : molécules au repos et orientées toutes de la même façon.

• Si la transformation d'un système consiste dans l'absorption réversible d'une quantité de chaleur très faible δQ à la température T, le gain d'entropie est par définition $\delta S = \delta Q/T$. D'après le second principe, l'entropie de l'univers augmente dans tout processus spontané, donc :

$$\frac{\delta Q}{T}\,\text{syst.} + \frac{\delta Q'}{T}\,\text{ext.} \geqslant 0$$

Si la somme est nulle le système est à l'équilibre.

Pour un système isolé, l'entropie croît dans toute transformation réelle ; elle décroîtrait dans la transformation inverse impossible. Cette forme d'énergie liée inéluctablement à l'effet thermique a une valeur minimum quand la transformation est réversible.

D'après le premier principe, la conservation de l'énergie impose :

$$\frac{\delta Q'}{T}\,\text{ext.} = \frac{-\,\delta H}{T}\,\text{syst.}$$

lors d'une transformation à pression constante.

Soit : $$\frac{\delta Q}{T}\text{ syst.} + \frac{-\delta H}{T}\text{ syst.} \geqslant 0$$

ou encore, pour une transformation finie

$$\Delta S \text{ syst.} - \frac{\Delta H}{T}\text{ syst.} \geqslant 0 \qquad \Delta H \text{ syst.} - T\,\Delta S \text{ syst.} \leqslant 0 \,.$$

L'expression $\Delta H - T\,\Delta S$, qui ne concerne que le système, est notée ΔG et correspond à la variation de la fonction G, appelée **enthalpie libre,** au cours de la transformation dans les conditions précisées ci-dessus. Elle représente la variation d'énergie utilisable, intégralement transformable en travail dans ces conditions de réversibilité. De plus, pour que la transformation soit spontanément possible il est donc nécessaire que $\Delta G \leqslant 0$, le cas limite de l'égalité correspondant à l'équilibre.

Pour notre exemple : $\Delta G = -237$ kJ/mole et $T\,\Delta S = -49$ kJ/mol d'où $\Delta S = -49/298 \approx -0{,}16$ kJ/K.

• Dans la transformation identique mais réalisée selon un *processus non réversible,* l'énergie utilisable est moindre et il y a en conséquence, production de davantage de chaleur.

• Enfin, pour une *transformation réversible à volume constant* ($\Delta V = 0$), on définit par analogie une fonction **énergie libre** F telle que $\Delta F = \Delta U - T\,\Delta S$. En biochimie, ΔF et ΔG sont souvent confondues, ce qui revient à admettre que $P\,\Delta V$, donc ΔV, est négligeable compte tenu qu'il s'agit de réactions en solution.

II. APPLICATION AUX RÉACTIONS CHIMIQUES

A. Evolution des réactions chimiques

Tout mélange de composés chimiques constitue un système qui, placé dans des conditions définies, va évoluer vers un état stable. La transformation est traduite par une ou plusieurs équations de réactions qui doivent être, au moins théoriquement, considérées comme réversibles.

Soit : $\alpha A + \beta B \rightleftarrows \gamma C + \delta D$.

En biochimie, ces systèmes peuvent, en première approximation, être considérés comme homogènes (solutions aqueuses) et évoluant à température et pression constantes. D'après *la loi des équilibres chimiques,* ils sont caractérisés par une *constante d'équlibre* K, telle que :

$$K = \frac{(C)^{\gamma}\,(D)^{\delta}}{(A)^{\alpha}\,(B)^{\beta}}$$

(A), (B),... représentent les concentrations molaires, confondues ici avec les activités, à l'équilibre.

C'est la variation d'enthalpie libre ΔG qui va déterminer la possibilité d'évolution, le sens et l'importance de la transformation.

• L'enthalpie libre ne peut que décroître dans les transformations naturelles réalisées à température et pression constantes, quand elle atteint sa valeur minimum, la réaction n'évolue plus, on est à l'équilibre.

Si, au cours de la réaction, la variation d'enthalpie libre est négative ($\Delta G < 0$), car la réaction cède du « travail » au milieu extérieur, elle est alors spontanément possible. C'est une ***réaction exergonique.***

Si au contraire la ***réaction*** est ***endergonique*** ($\Delta G > 0$), elle ne pourra se produire qu'avec un rapport d'énergie convenable.

Si $\Delta G = 0$, il n'y a pas d'évolution, c'est un ***équilibre stable.***

La variation d'enthalpie libre traduit, au signe près, *l'affinité chimique* des composés dans les conditions et selon le processus de la transformation envisagée.

La confusion va parfois plus loin en biochimie, ΔS étant toujours faible (absence de changement d'état, T toujours relativement basse) on assimile alors ΔG et ΔH, soit exergonique et exothermique d'une part ; endergonique et endothermique d'autre part. En fait ΔH et ΔG peuvent ne pas avoir le même sens. Une réaction endothermique peut être exergonique, donc spontanée si elle est accompagnée d'un accroissement important d'entropie. ***Ex.*** : fusion de la glace en eau, dénaturation protéique par élévation de température, etc. D'autre part une réaction exothermique n'est pas toujours spontanément possible.

De plus le fait qu'une réaction soit exergonique donc spontanément possible, au sens thermodynamique, n'implique pas qu'elle évolue avec une vitesse appréciable. Dans l'étude précédente le facteur temps n'est pas pris en considération. Il est souvent nécessaire, pour que la réaction ait lieu, qu'elle soit catalysée chimiquement ou enzymatiquement.

• L'enthalpie libre étant, comme les autres fonctions, extensive c'est-à-dire proportionnelle à la masse et dépendant des conditions physiques, il est nécessaire pour caractériser une réaction chimique de définir des états arbitraires spécifiés que l'on appelle *états de référence* ou *états standard.*

L'enthalpie libre de référence ou ***enthalpie libre standard*** symbolisée ΔG°, correspond à la transformation isotherme à 25 °C, à la pression constante de 1 atm, pour des activités des composés égales à l'unité.

— L'enthalpie libre de référence peut être calculée à partir de ΔU°, ΔH° et ΔS° ou mesurée dans une pile. Sa valeur dépend de la réaction considérée.

Ex. :

$$H_{2(G)} + 1/2\, O_{2(G)} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftarrows}} H_2O_{(Liq)} \quad \Delta G^\circ = -237 \text{ kJ/mol}$$

réaction fortement exergonique ;

$$CH_3COOH + C_2H_5OH \rightleftharpoons CH_3\text{—}COO\text{—}C_2H_5 + H_2O$$

$$\Delta G^\circ = -3{,}3 \text{ kJ/mol}$$

réaction faiblement exergonique ;

$$C_{16}H_{12}O_6 + H_3PO_4 \rightleftarrows C_6H_{11}O_5{-}O{-}PO_3H_2 + H_2O$$
$$\Delta G^{\circ} = + 12{,}5 \text{ kJ/mol}$$

réaction endergonique thermodynamiquement défavorisée.

Les valeurs ΔG° citées correspondent à la réaction évoluant de la gauche vers la droite ; dans le sens inverse c'est $- \Delta G^{\circ}$ qu'il faut considérer.

— L'enthalpie libre de référence est caractéristique, dans ces conditions, de la réaction. Elle détermine non seulement le sens, mais également l'importance de la transformation spontanément possible car ΔG° et K sont liées par la relation :

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K$$

dans laquelle R est la constante molaire des gaz parfaits et T la température absolue.

Un calcul rapide va nous permettre de préciser ceci. Sachant que :

$$R = 8{,}31 \text{ J/K.mol} \; ; \quad T = 273 + 25 = 298 \text{ K} \quad \text{et} \quad \ln x = 2{,}3 \lg x$$

nous pouvons écrire :

$$\Delta G^{\circ} = - 8{,}31 \times 298 \times 2{,}3 \lg K \approx - 5.700 \lg K$$

d'où :
$$\lg K \sim \frac{- \Delta G^{\circ}}{5.700}$$

Il en résulte que :

- Si $\Delta G^{\circ} = - 12{,}5$ kJ/mol

$$\lg K \approx + \frac{12.500}{5.700}$$

soit :
$$\lg K \approx + 2 \qquad \text{et} \qquad K \approx 10^{2} .$$

La réaction est pratiquement totale puisque :

$$(C)^{\gamma} \; (D)^{\delta} \approx 100 (A)^{\alpha} \; (B)^{\beta}$$

- Si $\Delta G^{\circ} = - 6$ kJ/mol, $K \approx 1$. La réaction aboutit à un équilibre dans lequel les concentrations des produits et des réactifs sont mesurables.
- Si $\Delta G^{\circ} = 12{,}5$ kJ/mol, $K \approx 10^{-2}$. La réaction n'a pratiquement pas lieu puisque :

$$(C)^{\gamma} \; (D)^{\delta} \approx 10^{-2} (A)^{\alpha} \; (B)^{\beta} .$$

En première approximation, seules les réactions pour lesquelles ΔG° est comprise entre ± 12,5 kJ/mol doivent être considérées comme réversibles et aboutissant à un état d'équilibre, les autres étant ou bien totales ou bien non spontanément possibles par suite de leur caractère fortement exergonique ou endergonique.

B. Application aux réactions se déroulant au sein de la matière vivante

Les principes thermodynamiques que nous venons d'étudier ne s'appliquent qu'à des systèmes fermés qui n'échangent pas de matière avec l'extérieur. De plus les systèmes doivent atteindre un véritable équilibre par une suite d'états réversibles dépourvus de frottements ; en thermodynamique classique le temps et la vitesse sont ignorés. Enfin, c'est une discipline statistique en ce sens qu'elle ne s'applique qu'à des populations de molécules.

La cellule vivante ne remplit donc pratiquement aucune de ces conditions d'où le développement d'une nouvelle thermodynamique des processus irréversibles ou encore du non-équilibre. Cependant au niveau de chaque réaction biochimique considérée isolément, les principes thermodynamiques classiques permettent une analyse quantitative des phénomènes.

— L'application des principes thermodynamiques à une réaction biochimique doit tenir compte du fait que les états standard préalablement définis ne sont jamais réalisés dans la matière vivante. En particulier, la température, le pH traduisant l'activité en ions H^+, les concentrations molaires des produits, etc., sont différents et ce n'est pas ΔG° qu'il faut considérer mais l'expression :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{(C)^\gamma\ (D)^\delta}{(A)^\alpha\ (B)^\beta}$$

dans laquelle (A), (B), etc., représentent les concentrations molaires dans les conditions physiologiques déterminées par l'équilibre dynamique. Enfin, une correction de température ($T = 273 + 37 = 310$ K pour les homéothermes) et une correction de pH (pH ≈ 7 soit $(H^+) \approx 10^{-7}$) sont souvent nécessaires. Il en résulte une différence parfois importante entre ΔG physiologique et ΔG°, ce qui modifie les possibilités d'évolution d'une réaction.

Ainsi lors de l'hydrolyse de la liaison phosphate terminal de l'ATP selon l'équation schématique :

$$\text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{ADP} + P_m{}^* \quad \Delta G^\circ = -\ 29\ \text{kJ/mol.}$$

Dans une cellule la concentration en ATP est environ 10 fois supérieure à celle de l'ADP et celle des phosphates minéraux est voisine de 10^{-2} mole/litre d'eau cellulaire. Donc ΔG est de l'ordre de $-$ 38 kJ/mol.

En fonction des concentrations cellulaires des produits et des substrats il est même possible qu'une réaction pour laquelle $\Delta G^\circ > 0$ puisse se produire spontanément ΔG étant alors négatif. Cependant, les concentrations réelles étant souvent inconnues on peut, dans une première approximation, raisonner à partir des valeurs standard ΔG°.

Les conventions qui permettent de définir l'enthalpie libre standard viennent d'être décrites, elles correspondent à des activités égales à 1 mol/l ; pour les ions H^+, cette valeur donne un pH égal à 0.

(*) P_m symbolise un résidu o.phosphate HPO_4^{2-} ou $H_2PO_4^-$ selon le pH.

Afin de prendre en compte la différence importante entre ΔG physiologique et ΔG°, citée à la page précédente, et définir l'exacte valeur de l'enthalpie libre standard des réactions biochimiques qui se déroulent à un pH voisin de la neutralité, on utilise de préférence, l'enthalpie libre standard à pH 7, notée $\Delta G^{\circ\prime}$, pour laquelle l'état standard est $[H^+] = 10^{-7}$ mol/l, cette valeur est donnée généralement à 25 °C.

III. LE COUPLAGE ÉNERGÉTIQUE

De nombreuses réactions métaboliques sont endergoniques. Il en est ainsi pour la plupart des réactions biochimiques de l'anabolisme ainsi que pour les premières étapes du catabolisme qui nécessite une activation du substrat (formation d'esters phosphoriques pour les oses par exemple). Pour se réaliser, ces réactions reçoivent un apport énergétique utilisable fourni par les réactions exergoniques du catabolisme. Il en résulte un véritable ***couplage énergétique*** entre les deux types de réactions.

— Du point de vue thermodynamique, une seule condition doit être satisfaite, la variation d'enthalpie libre de la réaction exergonique doit être supérieure, en valeur absolue, à celle nécessitée par la réaction endergonique ; de telle sorte que le système pris dans son ensemble fonctionne de façon exergonique.

Ainsi, la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate est une réaction endergonique défavorisée thermodynamiquement.

$$\text{glucose} + \text{Pm} \rightleftarrows \text{glucose 6 phosphate} + H_2O \quad \Delta G^{\circ\prime} = 12{,}5 \text{ kJ/mol} .$$

Par contre l'hydrolyse du phosphoénolpyruvate en pyruvate et phosphate est fortement exergonique.

$$CH_2{=}C(-O-Ⓟ){-}COOH + H_2O \rightarrow CH_3{-}CO{-}COOH + P_m \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -51{,}8 \text{ kJ/mol}$$

Phosphoénolpyruvate ou PEP — Pyruvate

On peut donc envisager, du point de vue thermodynamique, un couplage énergétique entre les deux réactions dont le bilan serait fortement exergonique $-51{,}8 + 12{,}5 = -39{,}3$ kJ/mol et correspondrait par suite à une transformation favorisée thermodynamiquement.

$$\text{Phosphoénolpyruvate} + \text{glucose} \rightarrow \text{glucose-6-phosphate} + \text{pyruvate}$$

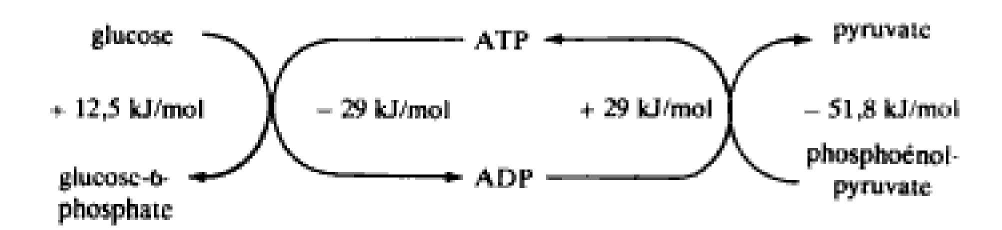
$$\Delta G^{\circ\prime} = -39{,}3 \text{ kJ/mol.}$$

— Du point de vue biochimique un tel couplage poserait le problème de la présence simultanée et au même point de la cellule des deux composés. La réalisation du couplage implique généralement que le transfert d'énergie d'une réaction à l'autre se fasse par l'intermédiaire d'un composé commun aux deux réactions, exergonique et endergonique. Ce composé commun, qualifié de « riche en énergie » assure ainsi le stockage provisoire et le transport de l'énergie d'une réaction à l'autre. L'ATP en est l'exemple le plus classique et le plus répandu.

D'où la sucession d'étapes :

$$\text{phosphoénolpyruvate} + \text{ADP} \rightarrow \text{pyruvate} + \text{ATP} \quad \Delta G^{\circ\prime} = -\ 22{,}8 \text{ kJ/mol}$$
$$\text{glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{glucose 6 phosphate} + \text{ADP} \quad \Delta G^{\circ\prime} = -\ 16{,}5 \text{ kJ/mol}$$

et le schéma du couplage énergétique



IV. LES COMPOSÉS RICHES EN ÉNERGIE OU COMPOSÉS A HAUT POTENTIEL ÉNERGÉTIQUE

A. L'adénosine triphosphate ou ATP

Ce composé existe dans toutes les cellules, animales, végétales et microbiennes à une concentration comprise entre 10^{-3} et $5 . 10^{-3}$ mol/litre d'eau cellulaire soit encore 0,5 à 2,5 mg/ml. Il est possible de l'extraire des tissus mais aussi de le synthétiser chimiquement en grande quantité.

1. STRUCTURE

C'est l'ester triphosphorique d'un nucléoside : l'adénosine. L'ester monophosphorique, l'adénosine 5′-monophosphate ou AMP est un nucléotide qui entre dans la composition des acides nucléiques, l'ester diphosphorique ou ADP est l'intermédiaire qui conduit à l'ATP.

La formule de l'ATP :

peut être schématisée, A—Rib—O—Ⓟ—O—Ⓟ—O—Ⓟ ou plus simplement ATP.

Au pH physiologique des cellules, voisin de 7, l'ATP est totalement dissocié et porte donc quatre charges négatives sur la chaîne polyphosphate (*). Il forme des complexes avec les cations cellulaires divalents Ca^{2+} et Mg^{2+}. En particulier avec Mg^{2+} il forme un complexe $[Mg\text{-}ATP]^{2-}$ qui présenterait une structure repliée différente de la formule linéaire précédente.

Structure possible du complexe $[Mg\text{-}ATP]^{2-}$ (d'après Lehninger).

2. LES « LIAISONS RICHES EN ÉNERGIE » OU LIAISONS A HAUT POTENTIEL ÉNERGÉTIQUE OU LIAISONS A FORTE ENTHALPIE LIBRE D'HYDROLYSE

La molécule d'ATP renferme trois liaisons covalentes O—P dont l'énergie de liaison, est comprise entre 209 et 418 kJ/mol. Toutefois, ces trois liaisons ne sont pas équivalentes.

- **La liaison O—P de l'AMP** est une liaison ester classique, analogue à celle du

(*) Les dissociations seront négligées par la suite pour simplifier l'écriture.

glucose-6-phosphate. Son hydrolyse est accompagnée d'une variation d'enthalpie libre standard de – 12,5 kJ/mol :

$$\text{AMP} + H_2O \rightarrow \text{adénosine} + P_m \ ; \qquad \Delta G^{\circ\prime} \approx -12{,}5 \text{ kJ/mol} .$$

Cette lia. .n, comme toutes celles qui libèrent moins de 12,5 kJ/mol lors de leur hydrolyse est dite pauvre en énergie, ou à faible potentiel énergétique.

• **Les deux autres liaisons O—P de l'ATP** sont du type liaison anhydride et leur hydrolyse s'accompagne d'une variation d'enthalpie libre standard de l'ordre de – 29 kJ/mol :

$$\text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{ADP} + P_m \ ; \qquad \Delta G^{\circ\prime} \sim -29 \text{ kJ/mol} \ ;$$

$$\text{ADP} + H_2O \rightarrow \text{AMP} + P_m \ ; \qquad \Delta G^{\circ\prime} \sim -29 \text{ kJ/mol} .$$

Ces liaisons que l'on retrouve dans les di- et triphosphates, sont représentées par le symbole ~ ; soit pour l'ATP : A—Rib—O—Ⓟ—O ~ Ⓟ—O ~ Ⓟ. Elles sont appelées « liaisons riches en énergie » ou encore liaisons à haut potentiel chimique d'hydrolyse ou liaisons à enthalpie libre d'hydrolyse fortement négative, ce qui est plus correct bien que les termes de liaisons et de composés riches en énergie soient d'un usage courant.

— L'énergie en cause n'a rien de comparable à l'énergie de liaison au sens chimique c'est-à-dire à l'énergie nécessaire pour briser les liaisons covalentes O—P. Il s'agit d'enthalpie libre fournie au cours d'une transformation provoquant la rupture de la liaison en présence d'accepteurs convenables.

— La teneur énergétique n'est pas liée à un type particulier de liaison, phosphate terminal par exemple, mais dépend de la nature du porteur du radical. Ainsi l'ATP est riche en énergie alors que l'AMP et le glucose-6-phosphate ne le sont pas.

L'importance de l'énergie en cause dépend des conditions, en particulier des concentrations des réactifs et des produits présents (ΔG peut être différent de ΔG° voir p. 17) mais aussi de la nature de l'accepteur. Le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à un nucléoside phosphate libère peu d'énergie alors que son transfert à un hydroxyle alcoolique du glucose par exemple en libère beaucoup.

— Pour comparer les énergies utilisables des liaisons riches des divers composés de ce groupe on utilise le réactif le plus répandu dans la matière vivante : l'eau. On se réfère à la variation d'enthalpie libre lors de **l'hydrolyse de la liaison.**

• *Quelle est l'origine de ce potentiel énergétique* ? L'ATP, l'ADP et les autres composés énergétiques que nous évoquerons par la suite sont toujours des molécules conjuguées riches en électrons π. Dans chaque cas, le potentiel énergétique résulte à la fois de plusieurs remaniements électroniques accompagnant l'hydrolyse.

Ainsi pour la liaison phosphate terminal de l'ATP, les contributions énergétiques partielles sont de :

— 12,5 kJ/mol pour l'hydrolyse de la liaison O—P

— 11 kJ/mol pour la stabilisation par résonance des produits d'hydrolyse.

L'ATP présente 7 formules mésomères, l'ADP 5 formules et le phosphate minéral P_m : 3 au pH de la matière vivante. La somme des énergies de résonance des produits d'hydrolyse (8 formules mésomères) est supérieure à l'énergie de résonance de la molécule initiale (7 formules).

— 5,9 à 9 kJ/mol pour les interactions électrostatiques qui sont diminuées lors de l'hydrolyse par suite d'une nouvelle répartition des électrons π modifiant la polarité des liaisons.

Pour d'autres composés riches en énergie, des phénomènes d'ionisation ou de tautomérisation participent à ces contributions énergétiques partielles.

L'hydrolyse de l'ATP peut également se faire avec libération de pyrophosphate selon l'équation :

$$ATP + H_2O \rightarrow AMP + PP \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -36 \text{ kJ/mol} .$$

Dans ce cas la contribution des phénomènes de résonance est accrue car les produits d'hydrolyse présentent 9 formules mésomères (3 + 6).

B. Les principaux composés riches en énergie

Pour tous ces composés $|\Delta G^{\circ\prime}|$ correspondant à l'hydrolyse est supérieure à 21 kJ/mol ; ce qui ne les empêche pas d'être stables en milieu aqueux. L'hydrolyse, bien que thermodynamiquement possible et irréversible, est extrêmement lente et nécessite, pour se dérouler à une vitesse appréciable, la présence de catalyseurs (enzymes).

1. LES PHOSPHATES A HAUT POTENTIEL D'HYDROLYSE

Ils comprennent :

— les *diphosphates* et les *triphosphates* :

Ⓟ—O~Ⓟ, Ⓟ—O~Ⓟ—O~Ⓟ

— les *di-* et *triphosphates de nucléosides*.

Ex. : L'ADP et l'ATP correspondant à l'adénosine, l'UDP et l'UTP correspondant à l'uridine, la GDP et la GTP correspondant à la guanosine, etc. ;

— *les acyl-phosphates :*

R—C(=O)—O~Ⓟ

CH_3—C(=O)—O~Ⓟ

Acétylphosphate

CO—O~Ⓟ | CHOH | CH_2O—Ⓟ

1-3 diphosphoglycérate

Ex. : L'acétylphosphate et le 1-3-diphosphoglycérate ;

— *les énol-phosphates :*

R—C(=CH_2)—O~Ⓟ

Ex. : le phosphoénolpyruvate ou PEP

CH_2=C(—O~Ⓟ)—COOH

— *les amidine-phosphates :*

$$R-NH-\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH\sim Ⓟ$$

Ex. : La créatine phosphate et l'arginine phosphate :

$$NH=C\begin{cases} NH\sim Ⓟ \\ \underset{\underset{CH_3}{|}}{N}-CH_2-COOH \end{cases}$$

Créatine phosphate

$$NH=C\begin{cases} NH\sim Ⓟ \\ NH-(CH_2)_3-CH\begin{cases} NH_2 \\ COOH \end{cases} \end{cases}$$

Arginine phosphate

— les *hémiacétal-phosphates ou glycoside-phosphates* ou P hétérosides sont à la limite des composés riches en énergie.

Ex. : Le glucose-1-phosphate.

2. LES ACYLS À HAUT POTENTIEL D'HYDROLYSE

— *les acyl-thioesters :*

$$R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}\sim S-R' \qquad CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-CoA$$

acétyl-coenzyme A

Ex. : Le principal représentant de ce groupe est l'acétyl-coenzyme *A*.

— les *acyl-imidazoles*. ***Ex.*** : l'acétyl-imidazole :

$$CH_3-CO\sim N\langle\text{imidazole}\rangle N$$

Acétyl-imidazole

— Les *acyl-phosphates* ont déjà été cités.

3. DES COMPOSÉS DIVERS COMME LES DÉRIVÉS SULFONIUM, AMMONIUM QUATERNAIRE, ETC

C. Le classement énergétique des composés riches en énergie

Il peut être schématisé à partir des valeurs de $\Delta G^{\circ\prime}$ et comparé à des dérivés phosphorés pauvres en énergie, esters d'alcools primaires par exemple.

$-\Delta G^{\circ\prime}$ kJ/mol	
	Phosphoénolpyruvate − 51,9
50	
	1-3 diphosphoglycérate − 49,4
	Créatine phosphate − 43,9
	Acétyl phosphate − 42,3
	ATP − 36 ou − 29
	ADP − 29
	Acétyl CoA − 26,4
25	PP − 25
	glucose-1-phosphate − 21
	glucose-6-phosphate − 13,8
	fructose-1-phosphate − 12,5
	glycérol-1-phosphate − 9,6
0	

Le tableau met en évidence les possibilités de transfert du groupe phosphate qui se fait toujours dans le sens décroissant des potentiels de cette échelle thermodynamique.

Dans ce tableau le système ATP-ADP occupe une position intermédiaire qui lui permet d'assurer la liaison par transport du groupe phosphate entre les composés phosphates à potentiel élevé et les composés à potentiel de transfert faible. Dans la cellule le groupement phosphate terminal de l'ATP aura donc une durée de vie très brève et devra être reformé très rapidement.

L'ATP peut également participer à la synthèse de composés riches en énergie comme l'acétyl CoA.

ATP + acétate + HSCoA

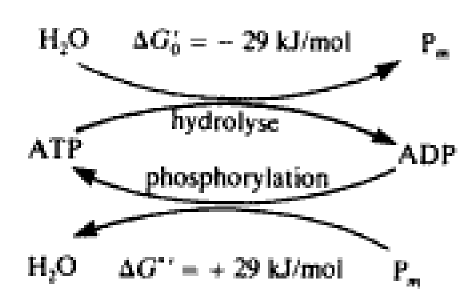
$\rightleftarrows$ Acétyl CoA + AMP + PP (Animaux, végétaux, levures)

$\rightleftarrows$ Acétyl CoA + ADP + P_{in} (Certains microorganismes)

V. ORIGINE ET RÔLE DES COMPOSÉS RICHES EN ÉNERGIE

Pour un homme adulte dont la dépense énergétique quotidienne est de 10.500 kJ, la consommation d'ATP est de plusieurs dizaines de kilogrammes d'ATP par jour ; ceci implique que l'ATP est consommé puis aussitôt régénéré à partir de l'ADP.

Quelle est l'origine de l'énergie nécessaire aux phosphorylations ? Les chimiotrophes tirent cette énergie de l'oxydation de substrats énergétiques, réactions qui se produisent en aérobiose et en anaérobiose. Les phototrophes convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique (photo-phosphorylation).



A. Les oxydo-réduction phosphorylantes

1. LES PHOSPHORYLATIONS AU NIVEAU DU SUBSTRAT

Il existe des réactions au cours desquelles l'oxydation d'un substrat énergétique est couplée à la constitution d'une liaison riche en énergie, un mécanisme de couplage permet la récupération d'une partie de l'enthalpie libre libérée par la réaction d'oxydation et l'emploie à la synthèse d'une liaison riche en énergie.

Des exemples seront rencontrés et décrits dans l'étude du métabolisme. Le mécanisme lié à l'oxydation du glyceraldéhyde-3-phosphate (étape de la glycolyse) est particulièrement significatif et sera étudié en détail ou lors de l'étude de cette voie métabolique.

Le bilan de la réaction est :

glycéraldéhyde-3-phosphate ($HC{=}O$ / $H-C-OH$ / CH_2-O-Ⓟ) + H_3PO_4 —[NAD^+ → NADH, H^+ ; glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase]→ acide 1-3 di-phospho-glycérique ($O{=}C-O\sim$Ⓟ / $H-C-OH$ / CH_2-O-Ⓟ) —[ADP → ATP ; 3-phospho-glycérate kinase]→ acide 3-phospho-glycérique ($COOH$ / $H-C-OH$ / CH_2-O-Ⓟ)

2. L'OXYDATION PHOSPHORYLANTE AU NIVEAU DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

Ce type de phosphorylation oxydative est un processus essentiellement aérobie lié aux systèmes transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. Le mécanisme de cette phosphorylation sera décrit ultérieurement, dans le chapitre consacré à la chaîne respiratoire des cellules eucaryotes.

B. La photophosphorylation

Les phosphorylations de la photosynthèse ou photophosphorylations sont les seules qui représentent un gain réel d'énergie utilisable pour la matière vivante. Contrairement aux deux modalités précédentes qui assurent simplement une conversion de l'énergie chimique, celle-ci permet la transformation de l'énergie rayonnante en énergie chimique assurant ainsi la pénétration du flux énergétique chez les êtres vivants.

C. Rôle des composés riches en énergie

Parmi les composés énergétiques que nous venons d'énumérer, les uns sont des *étapes du métabolisme*. ***Ex.*** : le 1-3-diphospho-glycérate, le phosphoénolpyruvate. Les autres sont de véritables *transporteurs d'énergie*. ***Ex.*** : ATP, ADP, ribonucléotides-triphosphates qui, en plus du transport d'énergie, permettent également le *transfert de groupements*. Ils peuvent être rangés dans la catégorie des coenzymes ou cosubstrats.

Dans toutes les transformations énergétiques l'ATP possède un rôle d'intermédiaire essentiel. Il participe à toutes les activités cellulaires : activation des substrats et biosynthèses, travail mécanique, électrique, production calorifique, travail osmotique de concentration et transport actif, etc.

3

La catalyse biochimique : les enzymes

D'après les principes thermodynamiques du chapitre précédent, il est nécessaire et suffisant pour qu'une réaction chimique soit spontanément possible qu'elle soit exergonique ($\Delta G < 0$) ou qu'elle soit couplée, dans le cas contraire, avec une réaction exergonique convenable, fournissant l'*énergie de réaction* nécessaire.

Dans ces données, le facteur temps n'est pas pris en considération. Ainsi les liaisons à haut potentiel d'hydrolyse sont très stables en solution aqueuse aux pH physiologiques, de même le mélange $H_2 + 1/2\ O_2$, dont la réaction est fortement exergonique, n'évolue pas spontanément dans les conditions ambiantes. Plus précisément, l'évolution vers la formation d'eau se fait avec une vitesse extrêmement faible. Cet équilibre apparent est métastable, car il suffit d'une élévation locale de la température (étincelle), c'est-à-dire d'un faible apport énergétique, pour augmenter considérablement la vitesse de la réaction au point de la rendre instantanée. Il s'agit là d'une *énergie d'activation*.

Le résultat est analogue, à la température ambiante, au contact de mousse de platine. Cette fois il n'est pas question d'apport énergétique, l'accroissement de la vitesse de réaction a une autre origine et l'on parle d'*effet catalytique* ou *catalyse*. Cet effet catalytique est essentiel en biochimie car nous avons déjà signalé qu'en son absence, les réactions biochimiques ne peuvent évoluer spontanément avec une vitesse suffisante dans les conditions de température et de pH du milieu vivant.

I. PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES ENZYMES

Comme les catalyseurs chimiques, les enzymes ne catalysent que des réactions qui sont thermodynamiquement possibles (réactions exergoniques ou réactions endergoniques couplées) car elles n'influencent pas l'énergie de la réaction, c'est-à-dire la variation d'enthalpie libre. Pour cette même raison les enzymes ne déplacent pas le point d'équilibre (K identique) et ne modifient pas les produits d'une réaction qui aurait lieu en leur absence.

Le parallélisme enzymes-catalyseurs chimiques n'est cependant pas total. Certaines caractéristiques sont spécifiques des enzymes et confèrent à la réaction enzymatique des propriétés particulières.

A. Définitions

Une enzyme est une protéine capable de catalyser spécifiquement la transformation d'un ou deux substrats :

$$S + S' \overset{E}{\rightleftarrows} P + P'$$

S et *S'* sont les substrats, *P* et *P'* les produits de la réaction enzymatique. On appelle isoenzymes, des enzymes élaborées par le même organisme, catalysant la même réaction et dont la structure protéique et les propriétés physico-chimiques sont différentes.

B. Structure protéique des enzymes

Biochimiquement les enzymes constituent un ensemble homogène puisque *toutes possèdent une structure protéique* correspondant à l'enchaînement de plus d'une centaine de résidus d'amino-acides. Les propriétés enzymatiques n'apparaissent qu'à partir d'un certain niveau de complexité structurale qui est cependant très variable puisque la masse moléculaire des enzymes varie d'environ 10^4 à plus de 2.10^6 daltons.

Ex. : Pour la ribonucléase la masse moléculaire est de 13.700 daltons, la molécule étant constituée par l'enchaînement de 124 résidus. Pour la glutamate déshydrogénase la masse moléculaire est voisine de 2.10^6 daltons.

Cette homogénéité de structure se traduit dans la nomenclature usuelle. Chaque enzyme est désignée par le nom de son substrat, c'est-à-dire de la substance dont elle catalyse la transformation, suivi du suffixe *ase*, par exemple : α glucosidase, fumarase, uréase, etc.

Quelques enzymes ont cependant gardé leur désignation ancienne, à suffixe ine en général : trypsine, pepsine, mais aussi lysozyme, présure, etc. Enfin il existe actuellement une nomenclature systématique qui sera envisagée lors de la classification des enzymes.

Etant des protéines, les enzymes en possèdent toutes les propriétés : réactions de précipitation, de coloration ; hydrolyses libérant les amino-acides, dénaturation...

A partir de la cristallisation de l'uréase par Sumner en 1926 un grand nombre d'enzymes ont été préparées à l'état pur, plusieurs centaines ont été cristallisées, ce qui a permis une étude précise de la structure primaire et de la structure spatiale dans un certain nombre de cas.

Les résultats obtenus montrent qu'il est nécessaire de distinguer plusieurs groupes d'enzymes bien que leur structure soit toujours du type globulaire.

— *La fraction protéique* qui est présente dans toute enzyme peut être constituée par une seule chaîne polypeptidique (structure monomérique) ou au contraire formée par l'assemblage symétrique, selon les règles de la structure

quaternaire des protéines, de plusieurs chaînes polypeptidiques (structure oligomérique).

Ex. :

• **Structure monomérique** du lysozyme à 129 résidus, de la trypsine à 223 résidus, de la ribonucléase à 124 résidus.

• **Structure oligomérique** de la lactate déshydrogénase à 4 sous-unités, M.M. 150.000 daltons, de la glutamate déshydrogénase à 8 sous-unités, etc.

Dans certains cas la fraction protéique peut à elle seule assurer l'activité enzymatique : l'enzyme est une holoprotéine, le plus souvent monomérique.

Ex. : ribonucléase, lysozyme, carboxypeptidase.

— D'autres nécessitent pour leur activité enzymatique la présence absolue, dans des proportions définies, d'une substance organique plus ou moins complexe, de faible masse molaire et qui participe à la transformation chimique. Lors de leur activité ces enzymes sont en quelque sorte des hétéroprotéines et l'on appelle *coenzyme* la fraction organique associée et *apoenzyme* la fraction protéique.

Ex. : lactate-déshydrogénase, transaminases, décarboxylases.

— Enfin l'activité de certaines enzymes dépend de la présence de *cofacteurs métalliques* liés plus ou moins solidement à la fraction protéique. Parmi ces cations un grand nombre figurent dans la liste des oligo-éléments et ainsi s'expliquent leurs effets catalytiques et leur caractère indispensable.

Ex. : Cu^{2+} pour les oxydases, Mn^{2+} pour l'arginase, Zn^{2+} pour l'anhydrase carbonique mais aussi Mg^{2+} pour la pyrophosphatase, etc.

Ces cofacteurs ne sont pas modifiés au cours de la réaction d'où leur nom d'activateurs. Leur absence peut provoquer une inactivation totale ou seulement partielle de l'enzyme. Selon les cas ils participent au mécanisme de la réaction catalysée (seuls ou en association avec un coenzyme) ou bien à la structure tridimensionnelle de l'enzyme.

C. Efficacité de la catalyse enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs très actifs plus efficaces que les catalyseurs chimiques. Comme tous les catalyseurs elles agissent à très faible concentration et sont régénérées après chaque cycle de réaction. Il en résulte un accroissement considérable de la vitesse de la réaction qui peut être ainsi multipliée par un facteur atteignant 10^8 et même 10^{11}.

Ex. : 1 g d'uréase libère environ 150 g d'ammoniac à partir de l'urée en 5 min ($t = 25$ °C, pH = 7).

1 g de catalase décompose 41.10^3 g d'eau oxygénée en 1 h à 20 °C.

On peut définir l'efficacité d'une enzyme par son *nombre de rotation (turn over number)* qui représente le nombre de molécules de substrat transformé par minute et par molécule d'enzyme. Ce nombre peut atteindre 10^4 à 10^8.

D. Spécificité enzymatique

C'est un caractère fondamental de l'activité enzymatique qu'il est facile de mettre en évidence dans les cas simples. Cette spécificité est double, chaque enzyme sélectionnant à la fois le substrat et la réaction catalysée.

1. SPÉCIFICITÉ DE RÉACTION

Pour un substrat donné, une enzyme ne catalyse qu'une seule réaction parmi l'ensemble de celles qui sont possibles. Ainsi un même amino-acide peut être décarboxylé, désaminé par oxydation ou transaminé (fig. 3.1) :

$R{-}CH(NH_2){-}COOH \xrightarrow{-2H,\ +H_2O} R{-}CO{-}COOH + NH_3$ Désamination

$R{-}CH(NH_2){-}COOH + HOOC{-}CH_2{-}CO{-}COOH \rightarrow R{-}CO{-}COOH + HOOC{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$ Transamination

$R{-}CH(NH_2){-}COOH \xrightarrow{-CO_2} R{-}CH_2{-}NH_2$ Décarboxylation

Figure 3.1 Réactions de transformation d'un acide aminé.

Chacune des trois réactions est catalysée par une enzyme différente : décarboxylase, transaminase ou amino-oxydase. Entre ces trois enzymes seule la partie protéique est totalement différente, c'est donc elle, et elle seule, qui est à l'origine de cette spécificité de réaction.

2. SPÉCIFICITÉ DE SUBSTRAT

Une enzyme n'agit que sur un seul substrat ou sur un groupe de substrats possédant en commun certaines particularités dans leur structure moléculaire. La spécificité de substrat dépend donc, soit de la molécule entière, soit de certains groupements seulement (cas des macromolécules) ; notamment de la position et de l'orientation des groupements ionisables ou polaires. Elle apparaît plus ou moins étroite, mais toujours liée à l'architecture spatiale des molécules : c'est une ***stéréospécificité.***

• Dans certains cas, l'enzyme n'agit que sur un *seul substrat,* plus précisément un *seul isomère*. (Spécificité étroite).

Ex. : La fumarase catalyse l'hydradation de l'acide fumarique (forme trans) en

acide *L* malique. Elle est inactive sur l'acide maléique (forme cis) :

H—C—COOH ‖ HOOC—C—H + H_2O ⇄ CH_2—COOH | HO—C—COOH | H   H—C—COOH ‖ H—C—COOH

Acide fumarique   Acide L malique   Acide maléique (non substrat)

— La déshydradation des deux isomères optiques de l'acide tartrique (*D* et *L*) en acide oxalo-acétique HOOC—CH_2—CO—COOH inactif est réalisée par deux enzymes différentes : la L-tartrate déshydrogénase et la D-tartrate déshydrogénase.

Inversement, la synthèse de composés asymétriques à partir d'un substrat inactif aboutit toujours à la même forme optiquement active pour une enzyme donnée. Ainsi dans le muscle, la réduction du pyruvate en lactate conduit toujours à la forme *L*(+) selon l'équation :

COOH | C=O | CH_3 + NADH, H^+ $\xrightarrow{LDH}$ COOH | HO—C—H | CH_3 + NAD^+

pyruvate   L(+) lactate

Ce mode de synthèse asymétrique est différent de la synthèse chimique qui produit généralement un mélange racémique. Il permet de comprendre l'origine et l'importance de l'asymétrie en biochimie.

• Dans d'autres cas, la spécificité de l'enzyme ne se manifeste que *pour un ou plusieurs groupements* (spécificité de groupe).

Ex: La β-galactosidase catalyse l'hydrolyse des β-galactosides (fig. 3.2).

CH_2OH, HO, O, OH, OH —O—R + H_2O ⇄ CH_2OH, HO, O, OH, OH HOH + ROH

Figure 3.2 Réaction d'hydrolyse des β-galactosides

La réaction a lieu, plus ou moins rapidement, avec des radicaux *R* très différents (*R* peut être un reste d'hexose, un radical aliphatique ou aromatique), mais le résidu β-galactosyl est indispensable : les hydroxyles 1, 2, 3, 4 doivent être libres et dans ces positions respectives, les dérivés méthylés ne sont pas hydrolysés, pas plus que les glucosides ou les α-galactosides. Cet exemple souligne bien l'importance de la configuration spatiale du substrat, c'est-à-dire la stéréospécificité.

Les β-D-thiogalactosides

ont une structure très proche de celle des β-D-galactosides. Ils sont capables de se fixer sur l'enzyme, d'y occuper la place du substrat, mais ne sont pas hydrolysés.

A l'intérieur des macromolécules protéiques ou nucléiques, c'est un *secteur limité, de configuration définie,* qui est identifié et préférentiellement ou même exclusivement attaqué.

Ex : La trypsine catalyse spécifiquement l'hydrolyse des liaisons peptidiques situées à droite des résidus lysine ou arginine, la chymotrypsine catalyse l'hydrolyse des liaisons situées à droite des résidus tyrosine et phénylalanine.

Ce n'est pas la liaison, mais l'environnement qui est identifié.

• La spécificité est parfois moins stricte, en rapport seulement avec un *groupement fonctionnel.*

Ex : Les lipases catalysent l'hydrolyse de la liaison ester glycérol-acide gras, sans spécificité nette pour l'acide.

L'alcool déshydrogénase catalyse la déshydrogénation non seulement de l'éthanol mais aussi d'autres alcools.

La spécificité de liaison est une spécificité dans laquelle seule une liaison est impliquée, c'est le cas de la broméline, protéase d'origine végétale extraite d'Ananas sativus qui coupe les chaînes peptidiques au hasard.

$$X-\underset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-NH-\underset{\displaystyle R}{\overset{|}{CH}}-Y + H_2O \rightarrow X-\underset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-OH + NH_2-\underset{\displaystyle R}{\overset{|}{CH}}-Y$$

De même que pour la spécificité de réaction, l'origine de la spécificité de substrat est tout entière dans la fraction protéique de l'enzyme. Elle peut être interprétée par la formation d'un complexe entre l'enzyme et le(s) substrat(s), ce complexe ne peut se faire que s'il existe une étroite complémentarité de structure entre le(s) substrat(s) et une partie de l'enzyme appelée site ou centre actif.

Enfin, cette double spécificité en rapport avec la structure spatiale des molécules protéiques et les mécanismes de l'action enzymatique, présente beaucoup d'intérêt pour l'étude structurale des substrats ; détermination de la configuration α ou β d'une liaison osidique par exemple.

E. Complexe intermédiaire enzyme-substrat

Les premières lois générales de la cinétique enzymatique formulées en 1905 par Henri puis Michaelis et Menten et généralisées par Haldane reposaient sur une hypothèse permettant d'interpréter les résultats alors obtenus.

La réaction enzymatique comporte deux stades :

• **1er stade :** *formation réversible d'un complexe enzyme-substrat stéréospécifique* impliquant une affinité est une complémentarité de structure entre les deux molécules.

• **2e stade :** *décomposition de ce complexe* donnant naissance aux produits de la réaction et régénérant l'enzyme.

Si l'on prend comme modèle une réaction simplifiée mettant en jeu une enzyme E, un substrat S, un produit P et un seul complexe enzyme-substrat ES, d'après cette hypothèse la réaction enzymatique peut être écrite :

$$E + S \rightleftarrows ES \rightleftarrows P + E$$

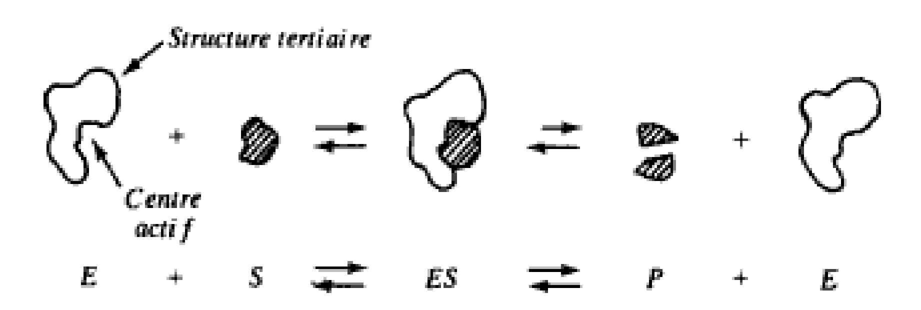


Figure 3.3 Représentation de la réaction enzymatique.

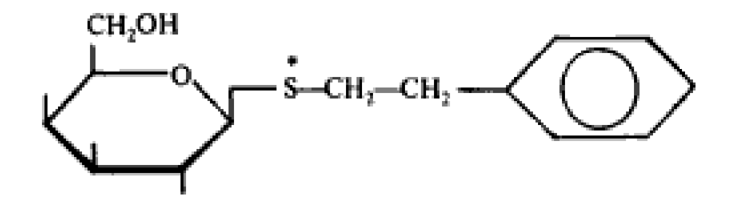
L'existence de ce complexe transitoire ES (fig. 3.3) a été vérifiée dans un certain nombre de cas.

— La peroxydase forme avec son substrat H_2O_2 un complexe ayant un spectre d'absorption caractéristique différent de celui de l'enzyme libre.

— La pepsine et l'un de ses substrats, l'ovalbumine, forment un complexe que l'on peut caractériser par ultracentrifugation.

— Une technique de dialyse (dite à l'équilibre) associée à l'utilisation d'analogues stériques de substrat, ce qui permet le 1er stade mais non le second, et à l'emploi de traceurs radioactifs permet la mise en évidence de la formation du complexe ES, de sa spécificité stérique, de sa réversibilité et enfin du rapport des quantités de E et S associés dans le complexe.

La plupart des expériences de dialyse à l'équilibre ont été décrites avec comme enzyme E : la β-galactosidase et comme ligand L : le PETG (phényl éthyl β-D-thiogalactoside) qui est un β-D-thiogalactoside se fixant sur l'enzyme, mais non transformé. Le ligand L est marqué par le ^{35}S radioactif.



Une solution d'enzyme est placée dans l'un des compartiments du dialyseur (fig. 3.4), dans l'autre, on place une solution du ligand L.

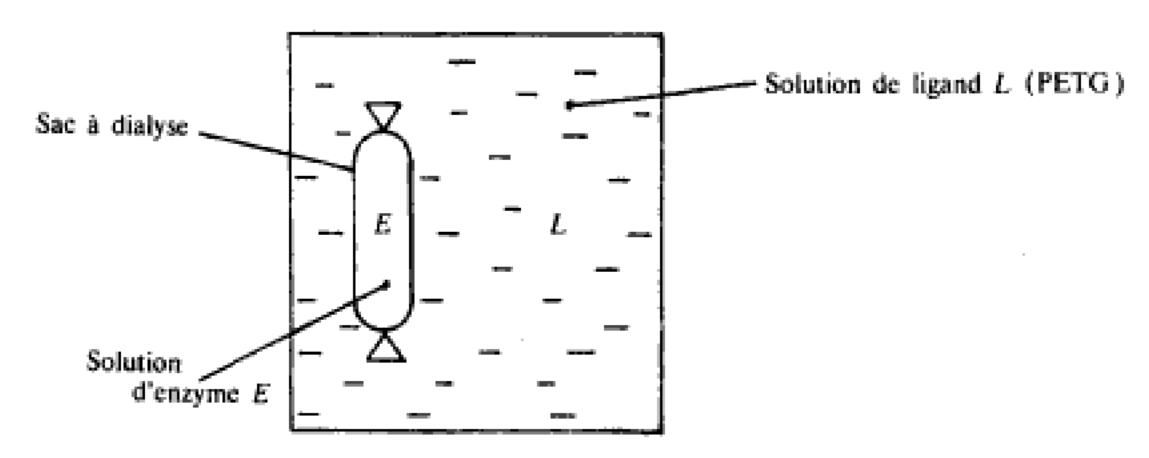


Figure 3.4 Schéma de dialyseur.

Au bout d'un certain temps, un équilibre s'établit, la concentration en ligand libre (L) est égale dans les deux compartiments.

On dose dans les deux compartiments la concentration de ligand en mesurant la radioactivité par unité de volume ; ce qui permet de déterminer :

— dans l'un des compartiments (L) : concentration molaire du ligand libre ;

— dans l'autre $(L) + (EL)$: concentrations molaires du ligand libre et du ligand associé à l'enzyme.

On représente par (E) la concentration molaire en enzyme libre
(E_T) la concentration molaire totale en enzyme
(R) la concentration molaire en récepteurs libres
(R_T) la concentration molaire totale en récepteurs.

Si n représente le nombre de récepteurs (sites de fixation) par molécule d'enzyme, on a : $n(E_T) = (R_T)$. La radioactivité par unité de volume étant plus élevée dans le compartiment du dialyseur qui contient l'enzyme, apporte, si besoin était, une preuve supplémentaire de l'existence du complexe enzyme-substrat.

Cette expérience permet, en outre, de dénombrer les sites de fixation de l'enzyme et de déterminer la constante K_A d'association du complexe.

En assimilant la formation du complexe à une réaction équilibrée, on peut écrire :

$$R + L \rightleftharpoons RL .$$

La constante d'équilibre K_A s'écrit : $K_A = \dfrac{(RL)}{(R)(L)}$.

En utilisant les relations écrites ci-dessus, on a :

$$(R_T) = n(E_T) = (R) + (RL)$$
$$(R) = n(E_T) - (RL) .$$

Sachant que :

$$\frac{(RL)}{(L)} = K_A \times (R) .$$

On a :

$$\frac{(RL)}{(L)} = K_A \, . \, n(E_T) - K_A(RL) .$$

La représentation de Scatchard (fig. 3.5) est celle de la fonction $\frac{(RL)}{(L)} = f(RL)$, cette équation est celle d'une droite dont la pente est $-K_A$ et dont l'abscisse du point de concours avec l'axe horizontal est égal à n.

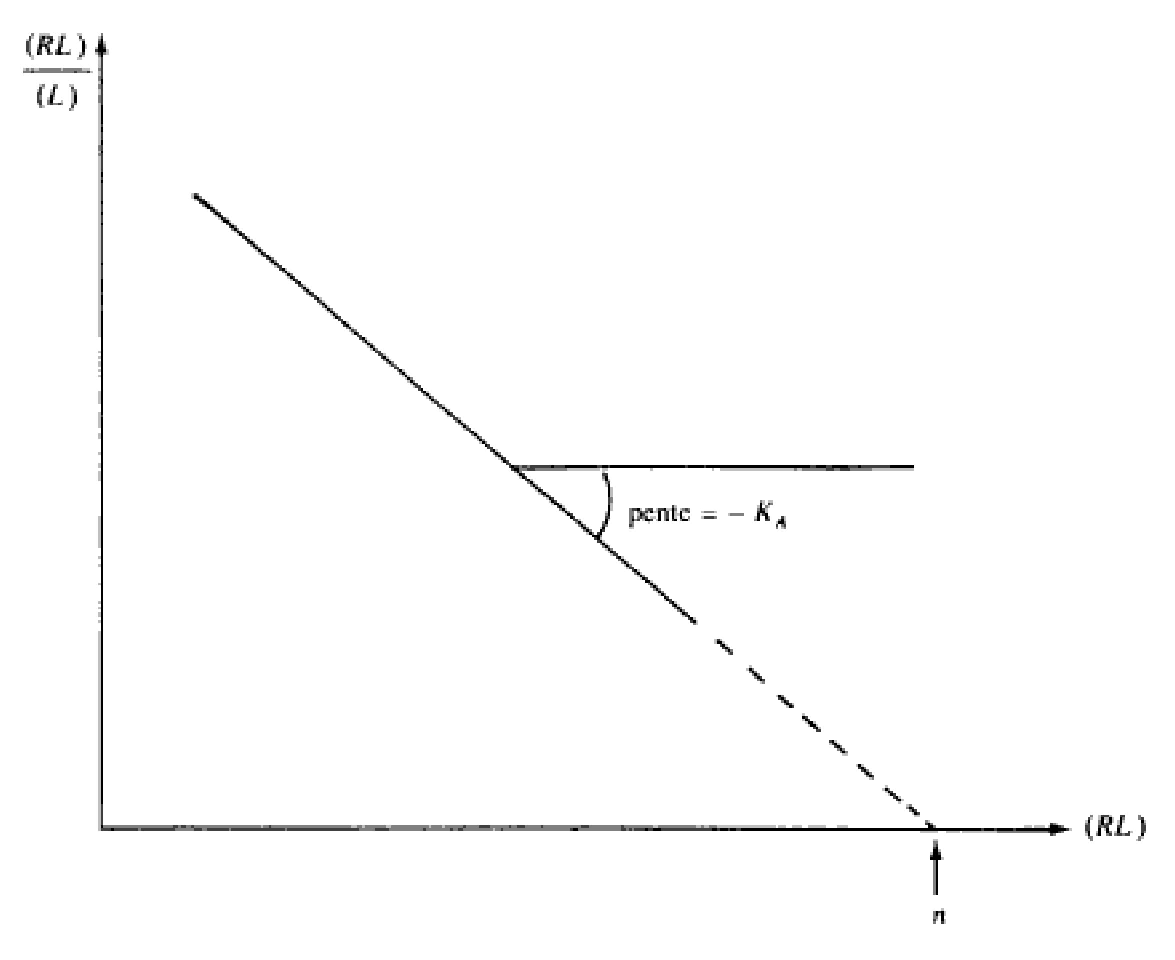


Figure 3.5 Représentation de Scatchard.

Cette expérience démontre que certaines enzymes peuvent fixer plusieurs molécules de S, il s'agit d'enzymes oligomériques et le nombre de sites de fixation est généralement égal au nombre de sous-unités.

La même technique permet de démontrer la réversibilité du complexe et la spécificité de sa formation.

Si l'équilibre étant atteint avec un β-thiogalactoside radioactif, on ajoute un β-thiogalactoside non radioactif à forte concentration, on constate que la radioactivité diminue dans le compartiment contenant l'enzyme, ce qui indique un déplacement du β-thiogalactoside radioactif de sa combinaison avec l'enzyme, donc la réversibilité du complexe.

Si on ajoute un glucoside ou un galactoside substitué sur le galactosyle, on n'observe aucun déplacement, la combinaison *ES* est donc spécifique.

F. Réversibilité de la réaction enzymatique

La réversibilité des processus chimiques est applicable à la réaction enzymatique, les réactions enzymatiques sont donc réversibles.

Dans les conditions physiologiques beaucoup de réactions enzymatiques sont réversibles (substrats et produits décelables à l'équilibre) certaines cependant sont pratiquement non réversibles (le substrat n'est pratiquement plus décelable).

Cette quasi-irréversibilité peut avoir plusieurs origines :

— barrière énergétique importante, c'est le cas d'une réaction fortement exergonique ;

— large excès de l'un des substrats, cas des réactions d'hydrolyse par exemple ;

— modification de la structure du produit formé. Si le produit libéré est un acide, il se trouve plus ou moins dissocié et l'anion ne peut réagir directement.

A ces exceptions près, la réaction enzymatique doit être représentée par un double équilibre :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} P + E$$

G. Notion de centre actif

La technique de dialyse à l'équilibre a permis de constater que le complexe *ES* ne se formait que pour un rapport *E/S* défini. D'autres observations et expériences mettent également en évidence une localisation de l'activité enzymatique à l'intérieur d'une molécule d'enzyme.

L'activité catalytique d'une enzyme est donc limitée à une région définie, de structure spatiale précise, de sa structure tertiaire. On appelle cette zone *centre ou site actif.*

Dans le cas d'une enzyme oligomère un site actif se retrouve sur chaque unité monomérique équivalente.

Lors du phénomène catalytique une seule molécule de substrat se trouve fixée par site actif.

La « géométrie » du centre actif a une importance considérable par suite de la stéréospécificité du complexe *ES*. L'influence de nombreux facteurs vis-à-vis de l'activité enzymatique est ainsi liée à leur action sur la structure de la protéine.

Le site ou centre actif de l'enzyme assure deux fonctions, la fixation et la transformation du ou des substrats. Pour certaines enzymes, on a pu démontrer que le centre actif était constitué d'un ou plusieurs **sites de fixation** et d'un **site catalytique,** distincts, mais proches l'un de l'autre.

II. LA CATALYSE BIOCHIMIQUE

A. Eléments de cinétique chimique

1. VITESSE D'UNE RÉACTION

La *vitesse d'une réaction chimique* et les facteurs dont elle dépend font l'objet de l'étude de la cinétique chimique. A partir de l'équation de réaction : $\alpha A + \beta B \rightarrow \gamma C + \delta D$, la vitesse de la transformation peut être déterminée en suivant la disparition des réactifs ou l'apparition des produits en fonction du temps (fig. 3.6).

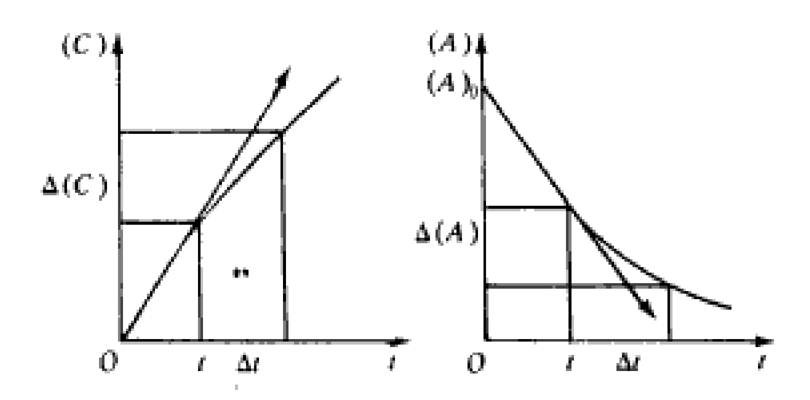


Figure 3.6 Vitesse d'une réaction chimique.

On peut alors définir une *vitesse moyenne* $\bar{v}$:

$$\bar{v} = \frac{\Delta(C)}{\Delta t} \quad \text{ou} \quad \bar{v} = \frac{-\Delta(A)}{\Delta t}.$$

et une *vitesse instantanée* au temps t qui n'est autre que la dérivée en fonction du temps de la concentration molaire de l'un des composés en présence, réactif ou produit

$$v_i = \frac{\mathrm{d}(C)}{\mathrm{d}t} \quad \text{ou} \quad v_i = \frac{-\mathrm{d}(A)}{\mathrm{d}t}.$$

v_i représente donc la valeur de la pente de la tangente à la courbe au temps t.

— Pour les réactions homogènes la vitesse dépend essentiellement de la concentration des réactifs. Elle est déduite de la loi de Van't Hoff selon laquelle :

$$v = k(A)^a(B)^b \qquad (1)$$

k est une constante de vitesse, fonction de la température ; a et b sont des nombres quelconques, mais déterminés sans ambiguïté, appelés *ordres partiels expérimentaux par rapport à A et B* ; $(a + b)$ est appelé *ordre global expérimental* de la réaction.

Si la réaction considérée est une réaction élémentaire, ne comportant qu'*une seule étape* sans intermédiaire, on constate alors que $a = \alpha$ et $b = \beta$. La relation (1) devient donc :

$$v = k(A)^{\alpha}(B)^{\beta}$$

et *l'ordre global de la réaction se confond alors avec sa molécularité* (nombre total de molécules figurant au premier membre).

Dans le cas contraire, il n'y a pas identité des valeurs et c'est l'étape la plus lente qui limite la cinétique de la réaction. Les valeurs a, b, $(a + b)$ correspondent alors aux coefficients moléculaires et à la molécularité de cette étape lente.

— Pour les réactions chimiques, en plus de l'influence de la concentration des réactifs, il faut signaler l'influence de la température. En effet la *constante de vitesse k* de l'équation (1) dépend de la température par l'équation d'Arrhénius,

$$k = K\,e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

dans laquelle : K est une constante caractéristique de la réaction, R est la constante des gaz parfaits, E_A est l'énergie d'activation de la réaction et T la température absolue.

La vitesse d'une réaction chimique augmente donc toujours avec la température mais cette variation présente peu d'intérêt pour, les réactions biochimiques se déroulant *in vivo* par suite de l'isothermie.

2. ORDRE D'UNE RÉACTION

Dans une réaction faisant intervenir plusieurs composés, on détermine l'ordre partiel par rapport à un constituant A en maintenant constantes les concentrations des autres réactifs, par exemple en utilisant des concentrations en excès.

La détermination de l'ordre se fait expérimentalement :

• **par rapport au temps :** à partir d'une concentration initiale donnée de la substance A, on suit les variations de la vitesse en fonction du temps ;

• **par rapport à la concentration :** on détermine alors la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations de la substance réagissante A. Le résultat obtenu est encore appelé ordre initial de la réaction.

Il peut arriver que les valeurs trouvées selon ces deux modes de détermination ne coïncident pas ; c'est le signe d'un mécanisme réactionnel complexe, la réaction n'a pas d'ordre par rapport à A ;

• on peut également étudier la **variation de la vitesse en fonction de la concentration.**

L'étude de la variation de la concentration du constituant A en fonction du temps permet de déterminer à chaque instant la vitesse de disparition de ce constituant.

La comparaison, à chaque instant, de la vitesse et de la concentration permet

d'en déduire l'ordre partiel par rapport à A

$$v = -\frac{d(A)}{dt} = k(A)^a$$

$$\ln v = \ln k + a \ln (A).$$

On peut tracer la courbe représentant la variation de $\ln v$ en fonction de $\ln (A)$; la pente de la droite représente l'ordre a.

Si l'on n'obtient pas une droite, la réaction n'a pas d'ordre par rapport à A. Il s'agit alors d'une réaction complexe.

— *Réaction d'ordre zéro.* Dans ce cas la vitesse est constante et indépendante de la concentration du réactif qui se transforme et par suite du temps : $V = k_0$.

Ce résultat paraît en contradiction avec la loi énoncée ci-dessus. En fait, la vitesse mesurée est la vitesse de transformation d'un composé intermédiaire dont la concentration demeure constante pendant la durée des mesures.

On rencontre des cinétiques d'ordre 0 dans certaines conditions en enzymologie.

— *Réaction du premier ordre.* Pour une réaction du premier ordre, par exemple du type $A \rightarrow C + D$ (décomposition) ou $A \rightarrow A'$ (isomérisation), la vitesse est proportionnelle à la concentration du réactif qui se transforme : $\nu = k_1(A)$.

Les réactions du premier ordre sont fréquentes en biochimie : dénaturation des protéines, évolution des traceurs radioactifs, réactions d'hydrolyse du fait que la concentration de l'eau n'est pratiquement pas modifiée au cours de la réaction. Dans ce dernier cas ordre et molécularité diffèrent.

B. La catalyse

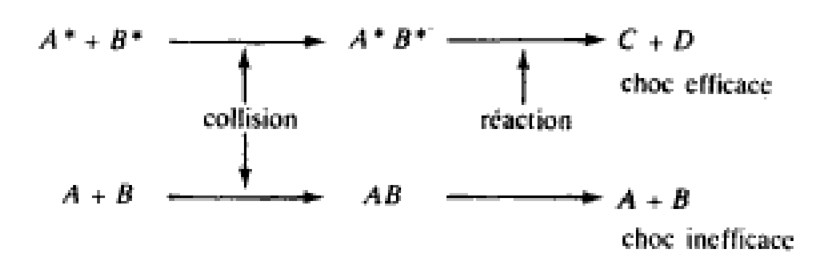
Pour qu'une réaction chimique thermodynamiquement possible se réalise avec une vitesse appréciable entre deux espèces moléculaires A et B, il est nécessaire que le nombre de *chocs efficaces* par unité de temps soit suffisant. Un choc efficace est une rencontre entre les molécules de A et B suivie de la transformation correspondant à la réaction chimique (*) $A + B \rightarrow C + D$. Ce qui impose deux conditions : des collisions d'une part, une efficacité d'autre part. Les collisions résultent de l'agitation moléculaire et plus la température sera élevée, plus les chocs seront nombreux. L'efficacité nécessite pour chacune des molécules une orientation définie et une énergie minimum généralement supérieure à l'énergie moyenne de la « population moléculaire ». Cette énergie moyenne dépend des conditions de milieu, en particulier de la température. La figure 3.7A représente schématiquement cette répartition de l'énergie à deux températures différentes 20 °C et 100 °C.

Si lors d'une collision les molécules possèdent l'énergie suffisante, elles vont former une association temporaire, le ***complexe activé*** ou ***complexe de transition.*** Il ne

(*) Pour simplifier, nous supposerons que dans l'équation les coefficients α, β, γ et δ sont égaux à l'unité. Ce cas est d'ailleurs le plus fréquent en biochimie.

s'agit pas là d'un état réel, stable, défini mais seulement d'une transition entre deux états qui ne peut pas être traduite par une formule moléculaire selon les règles usuelles. Parmi ces complexes activés, certains ont une énergie supérieure au minimum nécessaire et peuvent évoluer dans deux directions : retour à l'état initial $A + B$ ou passage à l'état final $C + D$. La réaction chimique peut se réaliser et sa vitesse dépend en particulier de la « concentration » en complexe activé.

En représentant par A^* ou B^* une molécule qui, à un instant donné, possède une énergie supérieure au minimum, on peut écrire :



L'évolution de l'enthalpie libre en fonction de la réaction se traduit par la courbe représentée sur la figure 3.7B. La comparaison avec les courbes A montre que la réaction n'aura pas lieu à 20 °C alors qu'elle se déroulera à 100 °C, car à cette température un certain nombre de molécules auront une énergie suffisante pour former un complexe activé franchissant la ***barrière énergétique*** ou ***barrière de potentiel*** qui sépare les réactifs, des produits de la réaction.

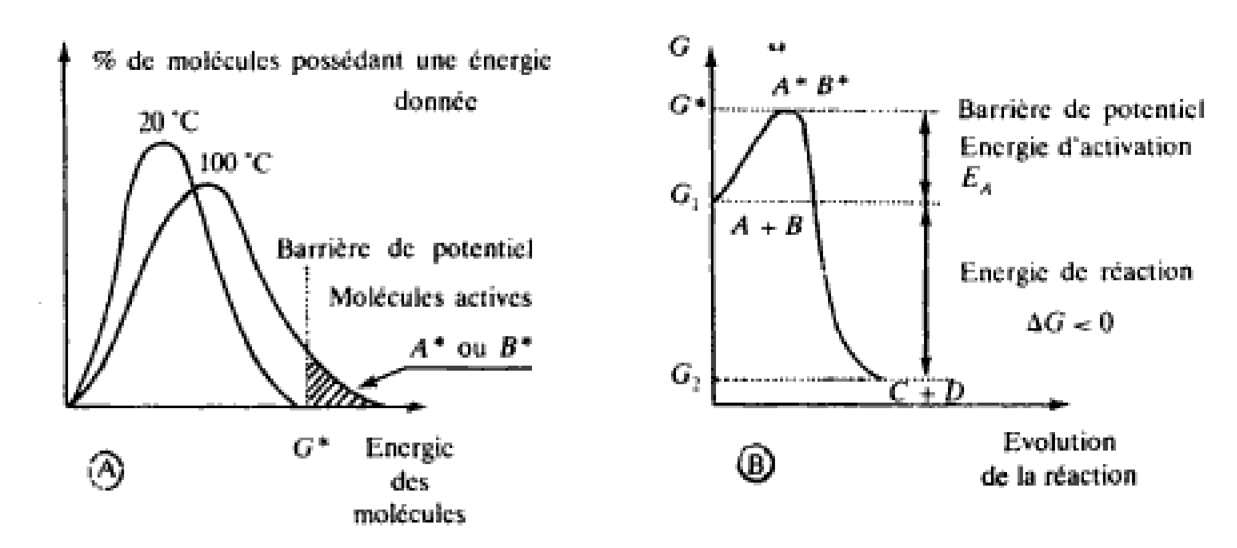
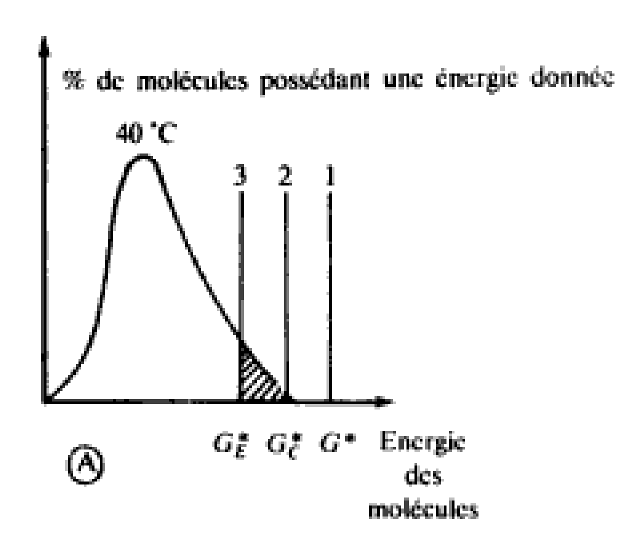


Figure 3.7 L'énergie d'activation.

A : répartition de l'énergie dans une population moléculaire en fonction de la température ; *B* : variations énergétiques au cours de la réaction chimique.

Un *catalyseur est un composé qui abaisse l'énergie d'activation nécessaire à la réaction.* En sa présence, la concentration en complexe activé augmente et par suite la vitesse de la réaction s'accroît. L'abaissement de la barrière de potentiel est plus important pour les catalyseurs biochimiques que sont les enzymes que pour les catalyseurs chimiques (fig. 3.8).



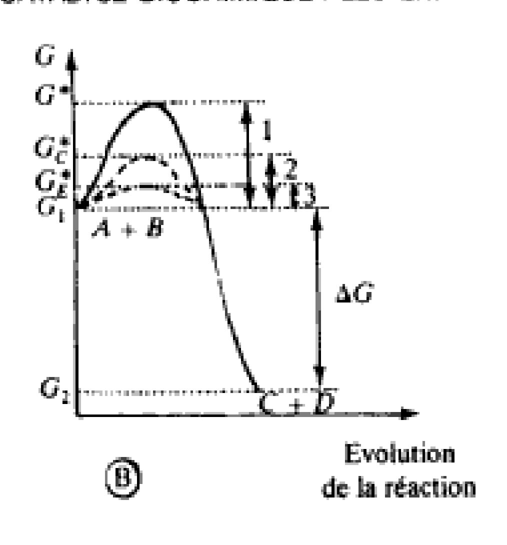


Fig. 3.8 Comparaison de l'effet catalytique et de l'effet enzymatique.
1 : énergie d'activation de la réaction non catalysée ; 2 : énergie d'activation de la réaction catalysée par un catalyseur chimique ; 3 : énergie d'activation de la réaction catalysée par une enzyme.

Ex. : L'énergie d'activation nécessaire à la décomposition de H_2O_2 est de 75 kJ/mol en l'absence de catalyseur, de 48,9 kJ/mol en présence de platine colloïdal et d'environ 8,4 kJ/mol en présence de *catalase*.

A une température donnée, compatible avec la structure de l'enzyme, la vitesse de réaction sera plus élevée en sa présence qu'en présence d'un catalyseur chimique, ce qui est fondamental pour la matière vivante.

Ex. : L'hydrolyse de l'amidon par *l'amylase* salivaire est rapide à 40 °C alors qu'elle est très lente à cette température en présence d'ions H^+ qui catalysent fortement son hydrolyse à 100 °C.

L'abaissement de la barrière énergétique est dû à ce que l'enzyme offre à la réaction une *voie différente* de celle que doit emprunter la réaction non enzymatique équivalente et par conséquent un *état de transition différent*. De plus les réactions enzymatiques comportent généralement plusieurs étapes successives nécessitant chacune la formation d'un complexe activé. Les intermédiaires étant voisins quant à leurs structures chimiques, les barrières de potentiel sont peu élevées. La plus élevée

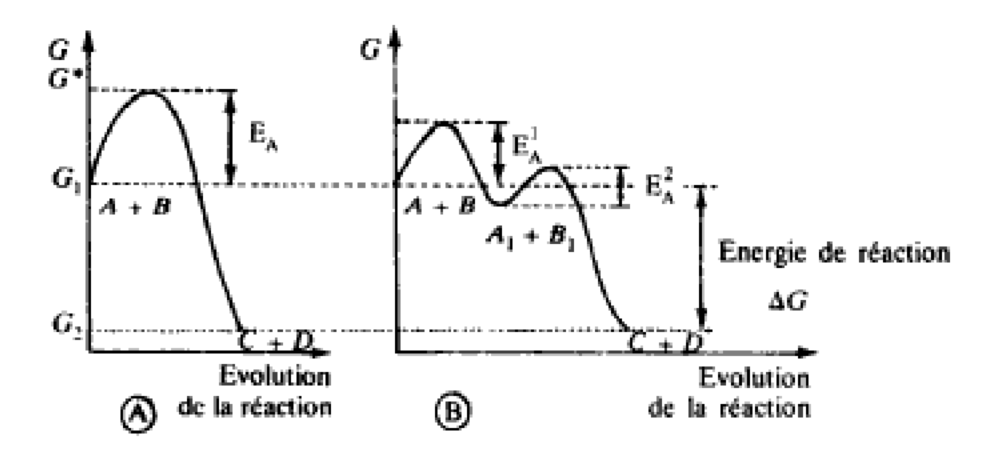


Figure 3.9 Comparaison des énergies d'activation.
A : réaction globale $A + B \rightarrow C + D$. *B* : réaction par étape $A + B \rightarrow A_1 + B_1 \rightarrow C + D$ ($E_A^1 < E_A$).

de la série, qui seule doit être considérée (étape la plus lente), est encore beaucoup plus basse que celle correspondant à la réaction globale (fig. 3.9).

D'autres mécanismes ont pu être invoqués pour rendre compte de l'abaissement de l'énergie d'activation ; fixés sur l'enzyme les (ou le) substrats bénéficient d'une orientation favorable, ce qui peut contribuer à diminuer l'énergie nécessaire à la transformation ; la fixation du substrat sur l'enzyme provoque un changement des orbitales moléculaires du substrat par la création de liaisons secondaires, ce qui peut expliquer une augmentation de sa réactivité.

III. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

A. Vitesse initiale d'une réaction enzymatique

C'est une donnée expérimentale essentielle pour l'étude cinétique.

Considérons une réaction enzymatique simple du type :

$$S \xrightarrow{E} P$$

cas par exemple, de l'hydrolyse de l'urée en présence d'uréase, puisque l'eau toujours en large excès a une concentration pratiquement constante (55 moles/l environ)

$$\underset{S}{CO(NH_2)_2} + 2\,H_2O \xrightarrow[\text{uréase}]{} (NH_4)_2CO_3$$

$$\qquad\qquad\qquad E \qquad\qquad P$$

Les conditions expérimentales étant fixées (pH, température, concentration), on réalise à partir du temps 0, correspondant au mélange de l'enzyme et du substrat, des prélèvements dans lesquels on dose l'ammoniac formé à des intervalles de temps définis. La courbe traduisant cette évolution est représentée ci-dessous (fig. 3.10).

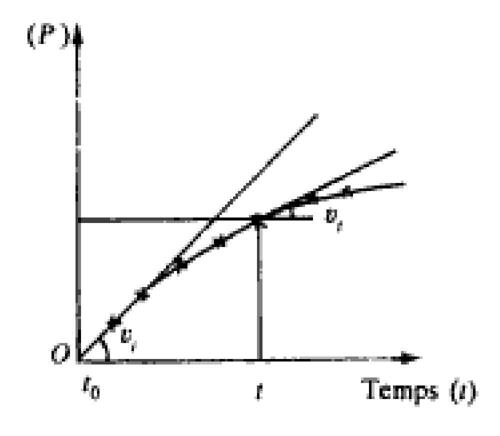


Figure 3.10 Vitesse d'une réaction enzymatique.

De cette courbe nous pouvons déduire la vitesse de la réaction à l'instant t [$v = d(P)/dt$] qui n'est autre que le coefficient angulaire de la tangente au point d'abscisse t.

La courbe est d'abord rectiligne, la vitesse v est donc constante, mais ceci ne correspond à une réaction d'ordre zéro que si l'on opère en présence d'un large excès de substrat.

Dans ces conditions, l'enzyme est saturée en substrat, toute augmentation de (S) ne modifie pas la vitesse.

Puis, au fur et à mesure que la réaction évolue, la vitesse décroît pour finalement s'annuler quand tout le substrat est consommé, ou quand il s'établit un équilibre

$$S \rightleftharpoons P \, .$$

La vitesse qui correspond à la partie rectiligne de la courbe et, à la limite, à sa tangente à l'origine est appelée **vitesse initiale** de la réaction (v_i), et lorsque l'on parle de vitesse de réaction enzymatique, c'est toujours de la vitesse initiale dont il est question (sauf spécification contraire).

La détermination de la vitesse initiale de la réaction correspond au début de celle-ci, quand peu de substrat est transformé (moins de 5 à 10 %).

B. Variations de la vitesse initiale

1. EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ENZYME

Si nous répétons la même expérience pour différentes concentrations en enzyme, (E), $2(E)$, $4(E)$, les résultats expérimentaux peuvent être traduits par les deux graphes ci-dessous (fig. 3.11).

La vitesse initiale est alors directement proportionnelle à la concentration de l'enzyme, elle traduit donc l'activité d'une préparation de l'enzyme. La réaction est du premier ordre par rapport à l'enzyme tout au moins tant que $(S)_0{}^* \gg (E)$ pour que toute l'enzyme soit en permanence sous la forme du complexe (ES).

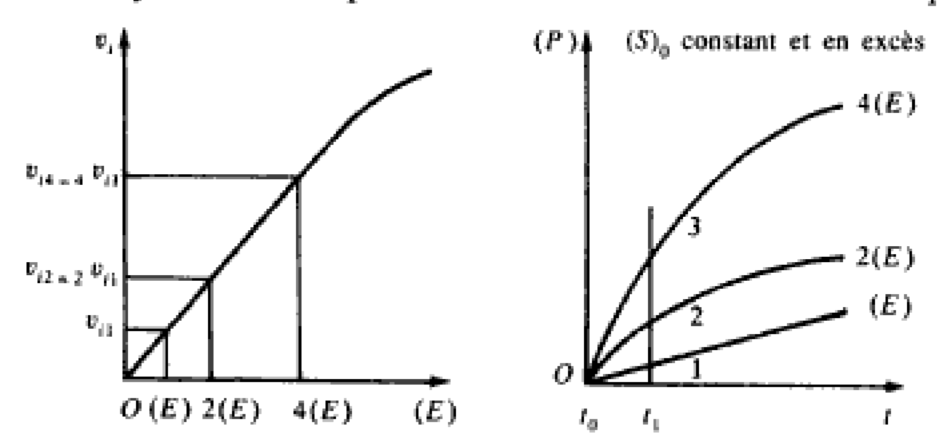


Figure 3.11 Variations de v_i en fonction de la concentration en enzyme.

* $(S)_0$ est la concentration en substrat au temps 0.

2. EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

On ajoute à des concentrations initiales variables en substrat $(S)_0$ la même dose d'enzymes. Pour chacune des expériences, on détermine la vitesse initiale à partir des courbes $[P] = f(t)$ (fig. 3.12).

Figure 3.12 Courbes $[P] = f(t)$ pour différentes concentrations initiales du substrat.

La variation de la vitesse initiale en fonction de $(S)_0$ (que l'on représentera par (S) dans un but de simplification*) est représentée par une branche d'hyperbole avec une asymptote pour $v = V_M$ (fig. 3.13).

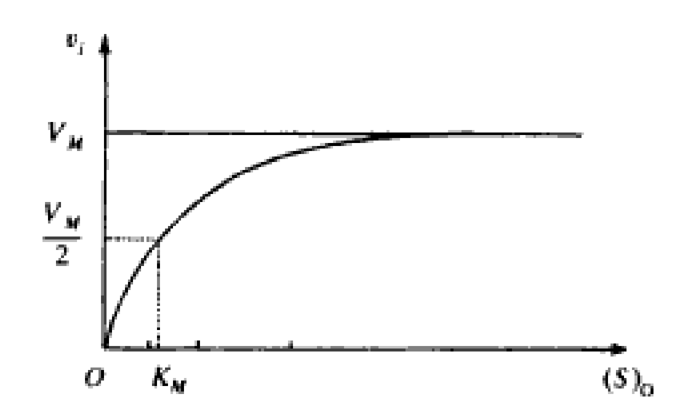


Figure 3.13 Variation de v_i en fonction de la concentration de substrat.

* Sauf spécification contraire la concentration de substrat représentée par (S) signifie toujours « concentration de substrat au temps 0 », représentée par $(S)_0$.

Ce graphique traduit un phénomène **de saturation de l'enzyme,** aux fortes concentrations de substrat, la vitesse est maximum en rapport avec la formation d'un complexe enzyme-substrat ; la réaction est d'ordre zéro par rapport au substrat.

Aux très faibles concentrations de substrat, la branche de courbe peut être confondue avec une droite, la vitesse est proportionnelle à la concentration de substrat, la réaction est d'ordre 1 par rapport au substrat.

C. Etude cinétique de la réaction enzymatique : Equation de Michaelis

— L'étude mathématique de la cinétique enzymatique découle du schéma réactionnel de Henri, Michaelis et Menten selon lequel l'activité catalytique est liée à la formation d'un *complexe enzyme-substrat spécifique et transitoire.*

Dans le cas le plus simple, on suppose que la réaction ne met en jeu, à la fois, qu'une seule molécule de substrat par molécule d'enzyme pour former un seul complexe au niveau d'un centre actif et que la réaction se déroule en une seule étape, sans produits intermédiaires. Comme seule la vitesse initiale est prise en considération, la concentration molaire de P est très faible et la réaction correspondant à k_4 peut être négligée en première approximation, d'où :

$$\boxed{E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_3}{\rightarrow} P + E} \ .$$

1. L'ÉQUATION DES VITESSES ET LA CONSTANTE DE MICHAELIS

La vitesse initiale de formation du produit est

$$v_i = k_3(ES) = \frac{\mathrm{d}(P)}{\mathrm{d}t} \ .$$

Dans les conditions initiales, si l'on applique l'approximation de l'état stationnaire, on a : $\frac{\mathrm{d}(ES)}{\mathrm{d}t} = 0$, la formation du complexe ES compense à chaque instant sa décomposition en $E + P$ et sa dissociation en $E + S$.

La figure 3.14 montre comment évoluent en fonction du temps : la concentration du produit P, du substrat S, du complexe enzyme-substrat ES et celle de l'enzyme libre E :

$$\frac{\mathrm{d}(ES)}{\mathrm{d}t} = k_1(E)(S) - k_2(ES) - k_3(ES) = 0 \ . \quad (1)$$

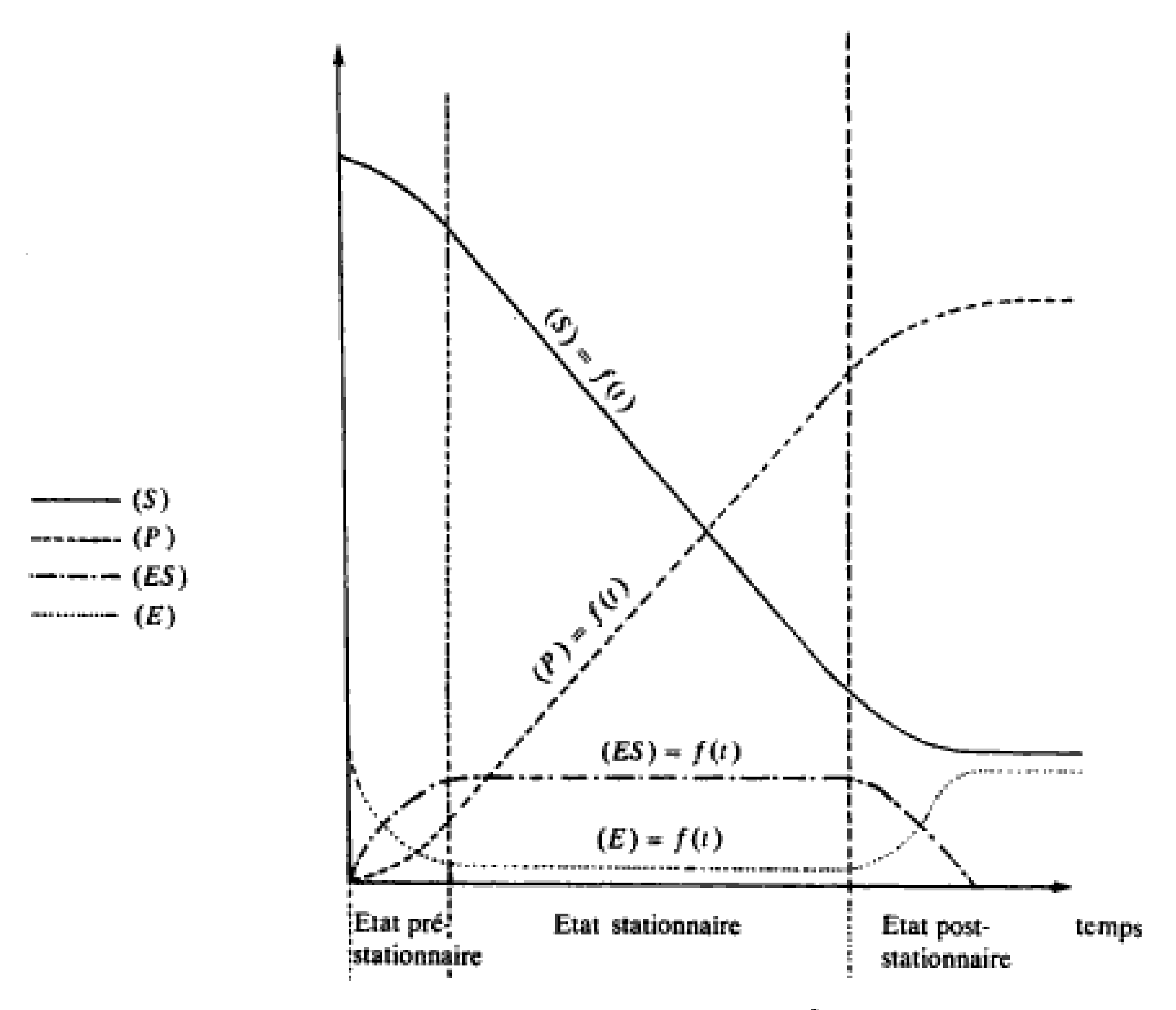


Figure 3.14 Courbes d'évolution des concentrations du substrat, du produit, du complexe *ES* et de l'enzyme libre en fonction du temps.
L'état pré-stationnaire est généralement très rapide, donc peu visible.
L'état stationnaire marque la durée des conditions initiales.
L'état post-stationnaire marque l'atteinte de l'équilibre ou la complétude de la réaction.

La concentration molaire en enzyme totale est :

$$(E_T) = (E) + (ES)$$

(1) devient

$$k_1[(E_T) - (ES)](S) - (k_2 + k_3)(ES) = 0$$

$$k_1[(E_T) - (ES)](S) = (k_2 + k_3)(ES)$$

soit $$[(E_T) - (ES)](S) = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1}(ES)\,.$$

On pose $\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M$, K_M constante de Michaelis

$$[(E_T) - (ES)](S) = K_M(ES)$$

$$(E_T)(S) = (ES)[K_M + (S)]$$

$$(ES) = (E_T)\frac{(S)}{K_M + (S)}$$

sachant que $v_i = k_3(ES)$, on pose $V_M = k_3(E_T)$ ce qui signifie que la vitesse maximum correspond à la vitesse initiale lorsque l'enzyme est « saturée ».

On a la relation de Michaelis-Menten :

$$\boxed{v_i = V_M \frac{(S)}{K_M + (S)}} \qquad (2)$$

qui peut s'écrire encore

$$v_i = k_3(E_T)\frac{(S)}{K_M + (S)}$$

K_M constante de Michaelis et V_M vitesse maximum représentent les deux constantes cinétiques de la réaction enzymatique.

L'équation de vitesse (2) est de la forme $v = \frac{ax}{b + x}$ représentée par une branche d'hyperbole équilatère

$$\text{si } (S) \to \infty , \qquad v \to V_M$$
$$\text{si } (S) \to 0 , \qquad v \to 0 .$$

Faisons dans l'équation (2) $v_i = \frac{V_M}{2}$, nous trouvons alors $K_M = (S)$.

La constante de Michaelis correspond donc à la concentration du substrat pour laquelle la vitesse atteint la moitié de la vitesse maximum.

On l'exprime en moles par litre de milieu réactionnel.

2. INTERPRÉTATION DE V_M ET K_M

• V_M correspond à la vitesse initiale maximum, quand l'enzyme est mise en présence d'un large excès de substrat. Pour des conditions physico-chimiques déterminées (température, pH, nature du substrat, composition du milieu, etc.), V_M représente **l'activité** de l'enzyme (on dit aussi de la préparation enzymatique, si cette dernière n'est pas pure). Les mesures d'activité permettent de doser l'enzyme*, elles sont fondées sur la proportionnalité qui existe entre V_M et (E_T) : $V_M = k_3(E_T)$ (fig. 3.11). Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques :

— **l'unité internationale** représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute ;

— le **KATAL** unité du SI**, représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde ;

* On parle alors de concentration catalytique d'enzyme.

** SI : système international d'unités.

— les **unités empiriques** étaient définies à partir du protocole expérimental qui permettait la mesure de l'activité. Elles ne sont plus utilisées, car elles étaient difficilement convertibles.

Exemple : L'une des unités empiriques d'uréase est définie comme la quantité d'enzyme qui produit, à partir de l'urée, 1 mg d'ammoniac en 5 min à pH 7 et à 30 °C.

Si la mesure de V_M est effectuée avec une enzyme pure de concentration molaire connue, il est possible de déterminer $k_3 = \frac{V_M}{(E_T)}$ également appelée k_{cat} (constante catalytique) ou **activité molaire spécifique.**

Cette grandeur exprime le nombre de moles de substrat transformé par minute et par mole d'enzyme. Mais c'est également une constante de vitesse que l'on peut exprimer en min^{-1} ou s^{-1}. Si l'on opère sur une préparation enzymatique impure, on ne connaît pas la concentration d'enzyme (E_T), on mesure une vitesse maximum et l'on exprime **l'activité spécifique** qui est l'activité rapportée à une unité de préparation enzymatique qui peut être le mg, le mg de protéines ou le cm^3 si l'échantillon est liquide. L'activité spécifique augmente au fur et à mesure que l'on purifie l'extrait.

• $\boldsymbol{K_M}$: on sait que $K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$, on ignore généralement les valeurs des constantes de vitesse k_1, k_2 et k_3.

Pour la plupart des enzymes, k_1 et k_2 sont grands par rapport à k_3 que l'on peut négliger, soit $K_M \simeq \frac{k_2}{k_1}$

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad K_D = \frac{(E)\,(S)}{(ES)}.$$

Dans le cas où k_3 est négligeable, K_M peut être assimilé à **la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat** et son inverse à la constante d'affinité :

$$K_M \simeq K_D = \frac{1}{K_A}.$$

L'affinité de l'enzyme pour le substrat est d'autant plus grande que la constante de Michaelis K_M est faible.

3. DÉTERMINATION DE K_M ET V_M

Expérimentalement on détermine, dans des conditions précises, la vitesse initiale de la réaction enzymatique pour différentes concentrations en substrat. Le mode de représentation utilisé figure 3.13 ($v_i = f[(S)]$) est délicat et nécessite un grand nombre de points. De plus dans certaines expériences la concentration de substrat qui permettrait la mesure de V_M est impossible à obtenir, sa solubilité étant trop faible.

Aussi lui préfère-t-on d'autres modes, en particulier celui de Lineweaver-Burk en coordonnées inverses (fig. 3.15).

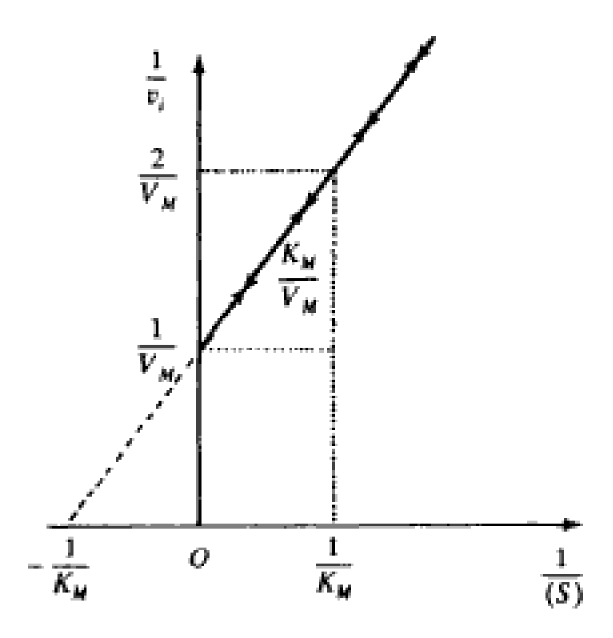


Figure 3.15 Détermination de K_M et V_M. Représentation graphique de Lineweaver.

En effet l'équation de Michaelis :

$$v = V_M \frac{(S)}{K_M + (S)}$$

devient alors :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_M}\left[\frac{K_M}{(S)} + 1\right] = \frac{K_M}{V_M} \times \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_M}$$

qui sera représentée par une droite puisque, si nous posons :

$$x = \frac{1}{(S)} \quad \text{et} \quad y = \frac{1}{v}$$

l'équation devient :

$$y = \frac{K_M}{V_M} x + \frac{1}{V_M}.$$

Les valeurs caractéristiques correspondent aux intersections avec l'axe des abscisses :

$$\left(y = 0\,; \qquad x = -\frac{1}{K_M}\right)$$

et avec l'axe des ordonnées :

$$\left(x = 0\,; \qquad y = \frac{1}{V_M}\right).$$

Cette représentation linéaire, plus précise, nécessite moins de valeurs expérimentales.

D'autres représentations sont utilisables : représentation d'Eadie (ν_i en fonction de $\nu_i/(S)$), représentation de Dixon ($[S]/\nu_i$ en fonction de $[S]$), etc.

4. CAS DES RÉACTIONS PLUS COMPLEXES

Au début de cette étude cinétique formelle, nous avons, pour simplifier, supposé certaines conditions réalisées : substrat unique, complexe unique et centre actif unique par molécule d'enzyme, absence de réversibilité dans la phase initiale. En réalité, les réactions sont plus complexes.

Les mécanismes les plus fréquemment rencontrés font intervenir deux substrats et deux produits :

$$A + B \rightleftharpoons P + Q, \quad \text{ils sont appelés bibi .}$$

Il existe cependant d'autres mécanismes, par exemple :

— **mécanisme terter** (3 substrats et 3 produits) c'est le cas de la glutamate déshydrogénase :

$$\text{glutamate} + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons \alpha\text{-cétoglutarate} + NADH, H^+ + NH_3$$

— **mécanisme terbi** (3 substrats et 2 produits) c'est le cas de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase :

$$3\ \text{phosphoglycéraldéhyde} + NAD^+ + P_i \rightarrow 1\text{-}3\ \text{diphosphoglycérate} + NADH, H^+ .$$

Nous n'envisagerons que les cinétiques de type bibi.

On peut distinguer le cas des réactions au cours desquelles il y a formation d'un complexe ternaire *EAB* de celles où il ne s'en forme pas.

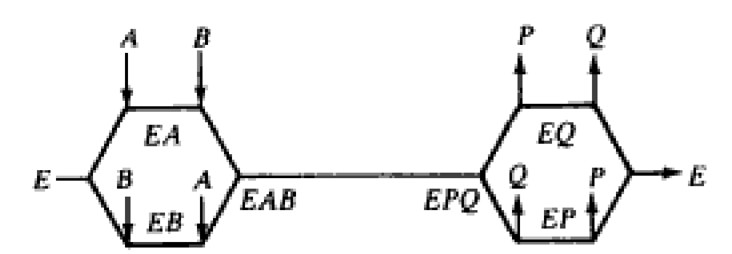
• **Réactions impliquant la formation d'un complexe ternaire.**

On distingue :

— le **mécanisme bibi aléatoire** dans lequel chacun des deux substrats est susceptible de s'associer à l'enzyme dans n'importe quel ordre :

$$E \rightleftharpoons EA \rightleftharpoons EAB \rightarrow E + P + Q$$
$$E \rightleftharpoons EB \rightleftharpoons EAB$$

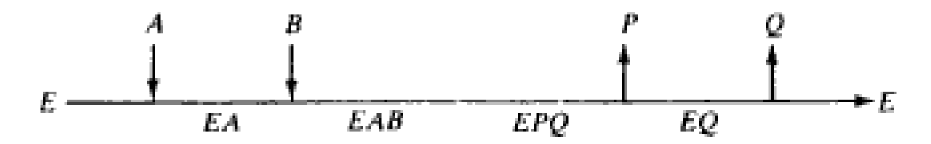
Le chemin réactionnel par lequel procède l'enzyme peut être mis en évidence par la représentation de Cleland :



La combinaison peut être **dépendante** si la fixation de l'un des substrats modifie l'affinité de l'enzyme pour l'autre ; elle est **indépendante** si l'association de l'un des substrats ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour l'autre.

— le **mécanisme bibi ordonné** où l'un des substrats doit préalablement s'associer à l'enzyme pour que la fixation du second soit possible.

Représentation de Cleland :



• **Réactions impliquant la formation d'un complexe binaire :**

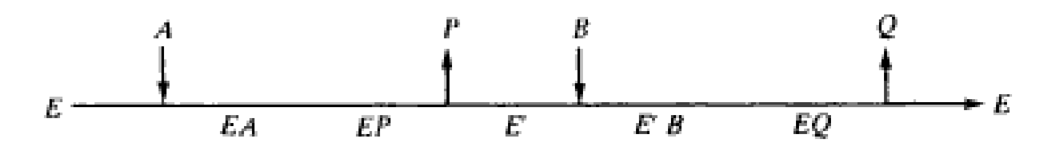
— **le mécanisme bibi ping-pong :**

La séquence des réactions est :

$$E + A \rightleftharpoons EA \rightleftharpoons E' + P$$
$$E' + B \rightleftharpoons E'B \rightleftharpoons E + Q$$

ce type de mécanisme sera décrit à propos de l'étude des transaminases.

Le chemin réactionnel est représenté selon Cleland de la manière suivante :

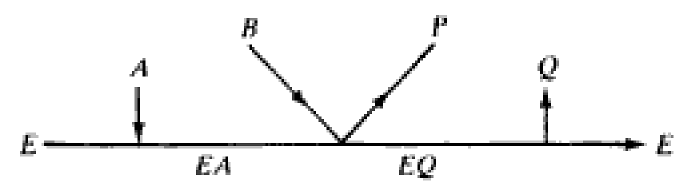


— **le mécanisme de Theorell-Chance :**

Le second substrat ne forme pas de complexe avec l'enzyme :

$$E + A \rightleftharpoons EA$$
$$EA + B \rightleftharpoons E + P + Q\,.$$

Représentation de Cleland :



Pour chacun de ces mécanismes, il est possible d'établir une équation de vitesse exprimant les variations de la v_i en fonction des concentrations des deux substrats.

On est donc en droit de se demander quel est l'intérêt d'établir une équation comme celle de Michaelis, valable pour un mécanisme élémentaire et peu fréquent (mécanisme que l'on pourrait qualifier d'uni-uni), alors que la majorité des mécanismes enzymatiques est de type bibi, et que d'autres mécanismes coexistent.

Cette loi, simple, représente une excellente approximation lorsque l'on fait varier la concentration de l'un des deux substrats et que l'on maintient l'autre constante.

A titre d'exemple, nous établirons l'équation de vitesse pour le mécanisme bibi

aléatoire, à combinaisons dépendantes, puis montrerons comment on peut, sous certaines conditions, lui donner la forme de l'équation de Michaelis.

On peut schématiser ce mécanisme, par les équations suivantes :

$$\begin{array}{ccccc} & & EA & & \\ & K_1^A \nearrow\!\!\swarrow & & \searrow\!\!\nwarrow K_2^B & \\ E & & & & EAB \xrightarrow{k_{cat}} E + P + Q \\ & K_1^B \searrow\!\!\nwarrow & & \nearrow\!\!\swarrow K_2^A & \\ & & EB & & \end{array}$$

A chacun des équilibres correspond une constante d'équilibre :

$$E + A \rightleftharpoons EA \qquad K_1^A = \frac{(E)(A)}{(EA)}$$

$$E + B \rightleftharpoons EB \qquad K_1^B = \frac{(E)(B)}{(EB)}$$

$$EB + A \rightleftharpoons EAB \qquad K_2^A = \frac{(EB)(A)}{(EAB)}$$

$$EA + B \rightleftharpoons EAB \qquad K_2^B = \frac{(EA)(B)}{(EAB)} .$$

Remarque : les combinaisons étant dépendantes $K_1^A \neq K_2^A$ et $K_1^B \neq K_2^B$

L'étape : $EAB \xrightarrow{k_{cat}} E + P + Q$ nous permet d'écrire :

$$v = k_{cat}(EAB) \qquad \text{et} \qquad V_M = k_{cat}(E_T)$$

donc

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(EAB)}{(E_T)} .$$

L'équation de conservation de l'enzyme est :

$$(E_T) = (E) + (EA) + (EB) + (EAB) .$$

$$(EA) = K_2^B \frac{(EAB)}{(B)} \qquad (EB) = K_2^A \frac{(EAB)}{(A)} .$$

$$(E) = \frac{K_1^A \cdot K_2^B}{(A)(B)} \times (EAB) = \frac{K_1^B}{(B)} \times \frac{K_1^A}{(A)} (EAB) .$$

Remarque : La dernière égalité permet d'écrire :

$$K_1^A \cdot K_2^B = K_1^B \cdot K_2^A .$$

Le système est donc défini par la valeur de trois des quatre constantes.

L'équation de vitesse peut s'écrire :

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(EAB)}{(E_T)} = \frac{(EAB)}{\dfrac{K_2^B(EAB)}{(B)} + \dfrac{K_2^A(EAB)}{(A)} + \dfrac{K_1^A K_2^B(EAB)}{(A).(B)} + (EAB)}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{1}{\dfrac{K_2^B}{(B)} + \dfrac{K_2^A}{(A)} + \dfrac{K_1^A . K_2^B}{(A).(B)} + 1} . \qquad (1)$$

Etude de l'équation $v = f(A)$ en supposant la concentration de B constante :

Multiplions numérateur et dénominateur du second membre de l'égalité (1) par $\dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)}$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{\dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)}}{\dfrac{K_2^B}{(B)} \cdot \dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)} + \dfrac{K_2^A}{(A)} \cdot \dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)} + \dfrac{K_1^A . K_2^B}{(A).(B)} \cdot \dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)} + \dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)}}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{\dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)}}{\dfrac{K_2^B.(A)}{K_2^B + (B)} + \dfrac{K_2^A.(B)}{K_2^B + (B)} + \dfrac{K_1^A . K_2^B}{K_2^B + (B)} + \dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)}}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{\dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)}}{(A)\dfrac{K_2^B + (B)}{K_2^B + (B)} + \dfrac{K_2^A.(B) + K_1^A . K_2^B}{K_2^B + (B)}}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{\dfrac{(A).(B)}{K_2^B + (B)}}{(A) + \dfrac{K_2^A(B) + K_1^A . K_2^B}{K_2^B + (B)}}$$

$$v = \frac{V_M \dfrac{(B)}{K_2^B + (B)} \cdot (A)}{(A) + \dfrac{K_2^A(B) + K_1^A . K_2^B}{K_2^B + (B)}} \qquad (2)$$

Cette équation est de forme michaélienne, il suffit de poser :

$$V'_M = V_M \frac{(B)}{K_2^B + (B)} \quad \text{et} \quad K_M^A = \frac{K_2^A(B) + K_1^A \,.\, K_2^B}{K_2^B + (B)}$$

et l'équation (2) devient

$$\boxed{v = \frac{V'_M \,.\, (A)}{(A) + K_M^A}}$$

En concentration **saturante** de substrat B, l'expression $V'_M = V_M \dfrac{(B)}{K_2^B + (B)}$ se simplifie puisque $(B) \gg K_2^B$ donc $V'_M = V_M$.

L'activité de l'enzyme représente donc la vitesse initiale lorsque les deux substrats sont en large excès (en concentration saturante).

K_M^A représente la constante de Michaelis pour le substrat A. Il existe une autre constante K_M^B pour le substrat B.

Sachant que $K_1^A K_2^B = K_2^A \,.\, K_1^B$, on peut écrire :

$$K_M^A = \frac{K_2^A(B) + K_1^A \,.\, K_2^B}{K_2^B + (B)} = \frac{K_2^A(B) + K_2^A \,.\, K_1^B}{K_2^B + (B)} = K_2^A \frac{[K_1^B + (B)]}{K_2^B + (B)} \,.$$

En présence d'un excès de substrat B, on a $(B) \gg K_1^B$ et $(B) \gg K_2^B$ donc $K_M^A \simeq K_2^A$, on démontrerait de même que $K_M^B \simeq K_2^B$.

D. Influence de la température sur les réactions enzymatiques

Expérimentalement, la détermination de la vitesse d'une réaction enzymatique à différentes températures conduit à une courbe complexe (fig. 3.16), qui représente la résultante de deux phénomènes différents :

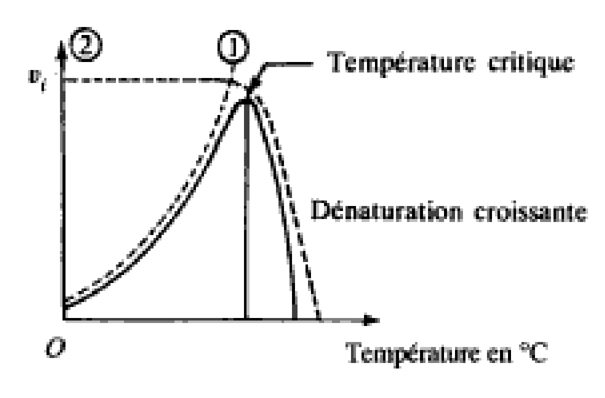


Figure 3.16 Influence de la température sur l'activité enzymatique.

— d'une part, une action de la température sur la *cinétique chimique* de la réaction enzymatique ;

— d'autre part, une *action dénaturante* de la température sur la fraction protéique de l'enzyme, ce qui entraîne son inactivation.

1. INFLUENCE SUR LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

La réaction enzymatique considérée dans son ensemble $S \xrightarrow{k} P$ est, comme toute réaction chimique, accélérée par une élévation de température ; sa constante de vitesse k suit la loi d'Arrhénius, de même que les constantes k_1, k_2, k_3, k_4. D'après ce qui précède, une variation de la température entraîne donc une modification des valeurs de K_M et V_M.

Dans la pratique, le domaine de température exploré va de 0 °C (273 K) à 60 °C (333 K) environ et, dans cet intervalle, la constante de vitesse k est multipliée par un facteur variant de 1,5 à 3 suivant les réactions, chaque fois que la température s'accroît de 10 °C (loi du Q_{10}*).

Ce résultat est représenté par la courbe 1 de la figure 3.16.

La loi d'Arrhénius s'écrit :

$$k = k_0 \, e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

k représente la constante de vitesse

k_0 est une constante

E_A l'énergie d'activation de la réaction

R la constante des gaz parfaits

T la température en kelvins.

La courbe 1 de la figure 3.16 est la représentation de la fonction :

$$v = k_0 \, e^{-\frac{E_A}{RT}} (E_T) \frac{(S)}{K_M + (S)} \quad \text{si } (E_T) \text{ et } (S)_0 \text{ sont constantes.}$$

C'est l'expression de la relation de Michaelis dans laquelle la constante de vitesse k_3 est remplacée par sa valeur donnée par la loi d'Arrhénius.

En concentration « saturante » de substrat, on a :

$$V_M = k_0 \, e^{-\frac{E_A}{RT}} (E_T) \, .$$

La mesure de V_M à des températures différentes, avec une concentration constante d'enzyme, permet la détermination expérimentale de l'énergie d'activation de la réaction.

* La loi du Q_{10} est une loi empirique qui stipule que la vitesse d'une réaction chimique est approximativement doublée lorsque la température augmente de 10 °C.

D'après la relation : $V_M = k_0 \, e^{-\frac{E_A}{RT}} (E_T)$ on peut écrire :

$$\ln V_M = \ln k_0 + \ln (E_T) - \frac{E_A}{RT}$$

soit
$$\ln V_M = \text{Cte} - \frac{E_A}{RT}.$$

La fonction $\ln V_M = f\left(\frac{1}{T}\right)$ est représentée (fig. 3.17) par une droite de pente $-\frac{E_A}{R}$.

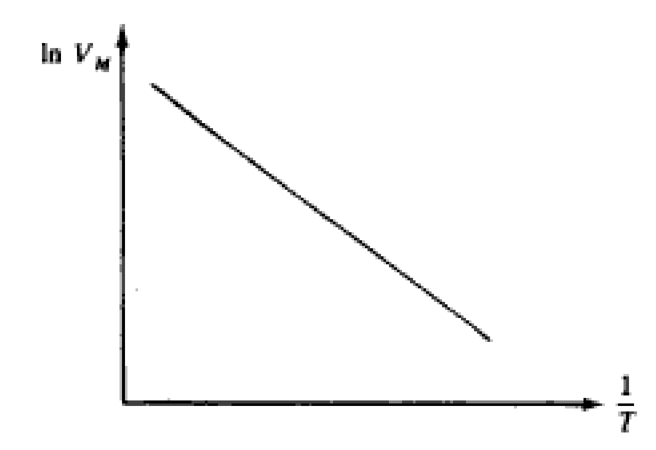


Figure 3.17 Courbe $\ln V_M = f\left(\frac{1}{T}\right)$.

Il suffit donc de déterminer graphiquement la pente de cette droite pour en déduire l'énergie d'activation E_A.

2. INFLUENCE SUR LA DÉNATURATION PROTÉIQUE

L'élévation de la température, qui accroît l'agitation moléculaire, provoque une dénaturation des protéines qui, dans le cas des enzymes, entraîne une inactivation le plus souvent irréversible. Cette modification de la structure chimique de la protéine enzymatique obéit à la loi d'Arrhénius également, mais il faut signaler quelques particularités (courbe 2 de la fig. 3.16).

- **La vitesse d'inactivation** est pratiquement nulle jusqu'à une certaine température dite critique (55 °C à 60 °C en général), puis s'accroît très rapidement ensuite, ce qui signifie que l'énergie d'activation de la réaction de dénaturation est importante.
- **La vitesse d'inactivation** à une température donnée varie selon les conditions du milieu (composition du milieu, pH, force ionique), selon l'enzyme (ce qui permet parfois un isolement) et selon son état libre ou combiné. L'enzyme combinée au substrat est plus résistante ; or d'après ce que nous connaissons de la dénaturation, ceci doit laisser supposer que le substrat est combiné au niveau du centre actif à des résidus d'amino-acides éloignés les uns des autres dans la séquence primaire stabilisant ainsi les structures secondaire et tertiaire.

Ce phénomène est complètement indépendant de l'influence de la température sur la cinétique enzymatique et la notion d' « optimum » de température est dépendante des conditions expérimentales. En particulier, il ne faut pas perdre de vue lors de la détermination de la vitesse maximum V_M que, selon la température et le temps de contact entre l'enzyme et le substrat, on peut obtenir des valeurs différentes ; certaines mesures étant faussées par suite d'une dénaturation plus ou moins rapide au cours de l'expérience.

La technique d'étude de la dénaturation thermique, sans l'interférence de la loi d'Arrhénius, consiste à chauffer la solution d'enzyme un temps donné (et constant) à différentes températures, puis ramener cette solution à une température standard (30 °C par exemple) et mesurer l'activité résiduelle de la solution ainsi traitée.

La dénaturation est une réaction d'ordre 1, aussi peut-on écrire

$$\frac{\mathrm{d}(E)}{\mathrm{d}t} = -k(E)$$

équation dans laquelle (E) représente la concentation d'enzyme encore active et k la constante de vitesse de la réaction de dénaturation :

$$\frac{\mathrm{d}(E)}{(E)} = -k\,\mathrm{d}t \qquad \int \frac{\mathrm{d}(E)}{(E)} = -k \int \mathrm{d}t$$

$$\ln (E) = -kt + \text{Cte} \quad \text{si} \quad t = 0 \quad \ln (E) = \ln (E)_0$$

soit

$$\boxed{\ln \frac{(E)}{(E)_0} = -kt}\,.$$

La représentation graphique de la fonction

$$\ln (E) = f(t)$$

est une droite (fig. 3.18), il en est de même de la fonction $\ln V_M = f(t)$, de pente $-k$.

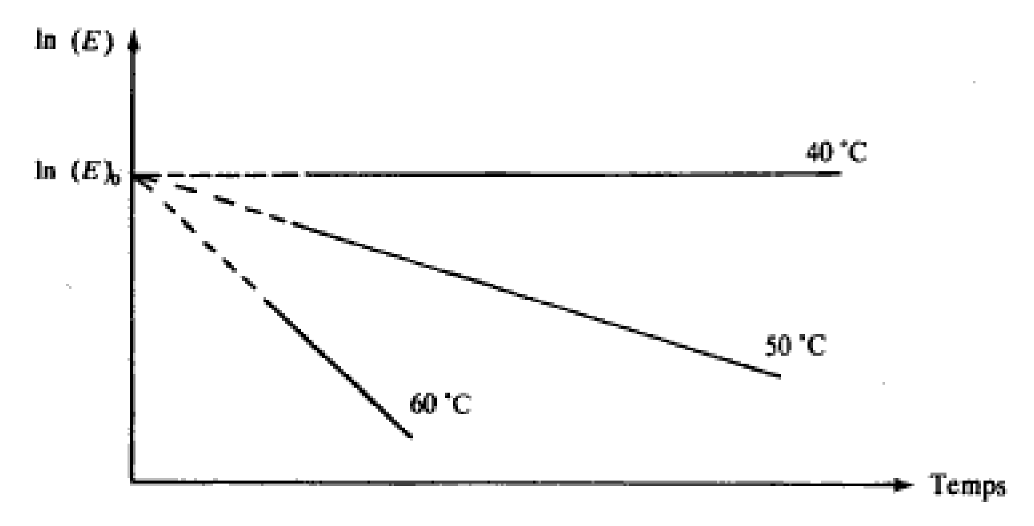


Figure 3.18 Courbes $\ln (E) = f(t)$ pour 3 températures différentes.

La constante k varie avec la température, puisque la réaction de dénaturation suit aussi la loi d'Arrhénius.

E. Influence du pH sur les réactions enzymatiques

L'activité de chaque enzyme dépend de la concentration en ions H^+ du milieu (fig. 3.19). Il existe dans tous les cas un pH *optimum* pour lequel l'activité est maximum et, de part et d'autre de cette valeur, une zone plus ou moins large où l'activité enzymatique est réduite par suite d'une inactivation. Le pH optimum peut être soit très acide (pepsine : entre 1,5 et 2,5), soit très basique (trypsine : entre 8 et 10, arginase vers 10), soit plus généralement voisin de la neutralité (compris entre 6 et 8).

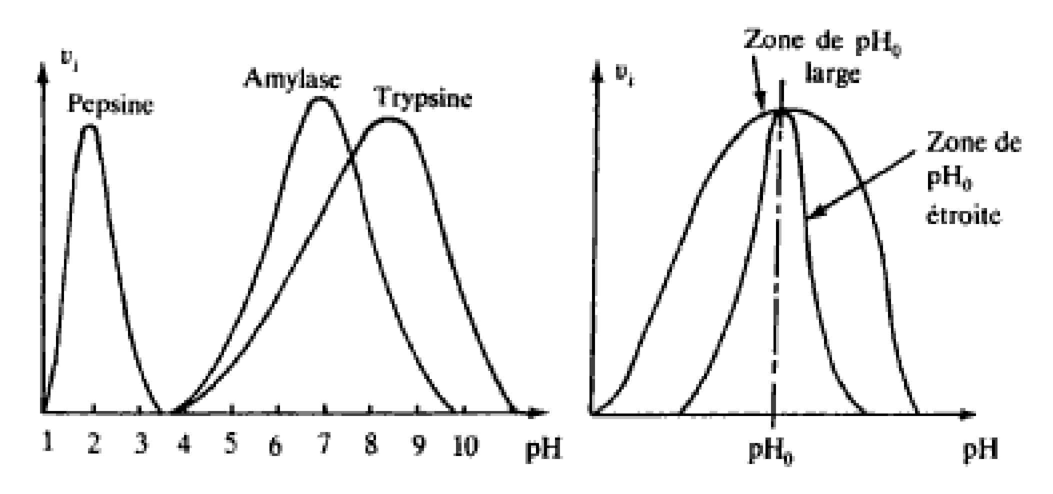


Figure 3.19 L'influence du pH sur l'activité enzymatique.

Cet effet du pH est lié à l'état d'ionisation d'un certain nombre de groupements dissociables participant à la formation et à l'activité du complexe enzyme-substrat. Les phénomènes de dissociation peuvent intervenir aussi bien pour le substrat que pour les chaînes latérales de la protéine enzymatique et il peut en résulter des modifications de conformation de la protéine, d'association avec le substrat et parfois une influence sur le phénomène catalytique. L'analyse de l'influence du pH sur la conformation et sur les paramètres de la réaction enzymatique K_M et V_M peut apporter des précisions sur le mode d'association *E-S* et sur le mécanisme de la réaction catalytique.

Il en résulte que le pH optimum n'est pas une caractéristique définie et constante pour une enzyme, mais qu'il varie selon : l'origine tissulaire de l'enzyme, le substrat, les substances associées. Le pH optimum précise seulement la zone où l'enzyme agit le plus activement. Comme il est nécessaire d'opérer dans cette zone lors d'une détermination de l'activité enzymatique, on doit limiter les variations de pH par l'emploi d'un système tampon convenable.

Les variations de pH peuvent modifier la conformation des protéines de deux façons :

— aux pH extrêmes, les enzymes peuvent être dénaturées irréversiblement ;

— au voisinage du pH_0, de faibles modifications de pH induisent des changements de conformation réversibles.

Pour faire la distinction expérimentalement, on expose l'enzyme pendant une durée constante à différents pH, puis on mesure son activité résiduelle au pH optimum de l'enzyme.

Afin d'étudier l'effet du pH sur les paramètres cinétiques de l'enzyme, posons comme postulat qu'au moins deux groupements ionisables présentant des pK différents, sont impliqués pour maintenir une conformation active à l'enzyme, et que la protonation ou la déprotonation d'un seul groupe suffit à induire une transition qui s'accompagne de la perte d'activité. La forme de l'enzyme est celle où l'un des groupements est protoné et non l'autre (fig. 3.20).

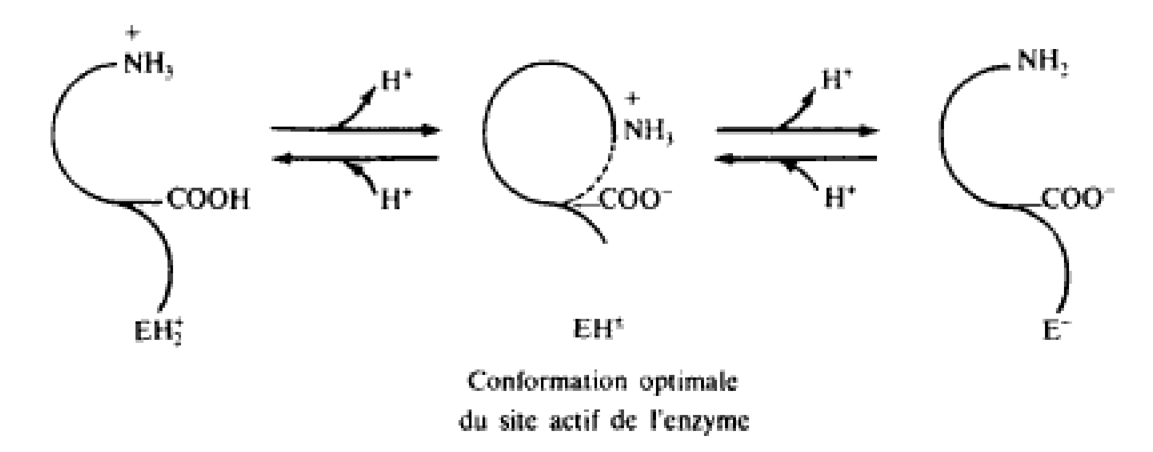
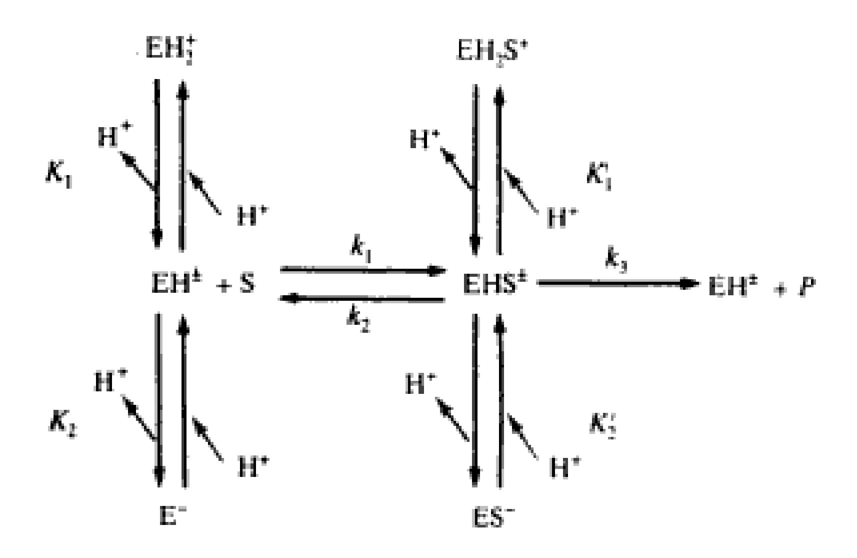


Figure 3.20 Représentation schématique des changements de conformation du site actif d'une enzyme sous l'effet du pH.

En admettant que $EHS^{\pm}$ est la forme active du complexe enzyme-substrat, et que les réactions d'ionisation sont rapides par rapport à la réaction enzymatique, on peut écrire le schéma suivant :



Les constantes d'acidité des différentes formes s'écrivent :

$$K_1 = \frac{(EH^{\pm})(H^+)}{(EH_2^+)} \qquad K_1' = \frac{(EHS^{\pm})(H^+)}{(EH_2S^+)}$$

$$K_2 = \frac{(E^-)(H^+)}{(EH^{\pm})} \qquad K_2' = \frac{(ES^-)(H^+)}{(EHS^{\pm})} .$$

La constante de Michaelis est :

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{(EH^{\pm})(S)}{(EHS^{\pm})} .$$

L'équation de conservation de l'enzyme est :

$$(E_T) = (E^-) + (EH^{\pm}) + (EH_2^+) + (ES^-) + (EHS^{\pm}) + (EH_2S^+) .$$

Sachant que : $v = k_3(EHS^{\pm})$ et $V_M = k_3(E_T)$, on peut écrire,

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(EHS^{\pm})}{(E_T)} = \frac{(EHS^{\pm})}{(E^-) + (EH^{\pm}) + (EH_2^+) + (ES^-) + (EHS^{\pm}) + (EH_2S^+)}$$

$$(EH^{\pm}) = \frac{K_M(EHS^{\pm})}{(S)}$$

$$(E^-) = \frac{(EH^{\pm})(K_2)}{(H^+)} = \frac{K_2 \,.\, K_M}{(H^+)} \cdot \frac{(EHS^{\pm})}{(S)}$$

$$(EH_2^+) = \frac{(EH^{\pm}) \,.\, (H^+)}{K_1} = \frac{K_M \,.\, (H^+)}{K_1} \cdot \frac{(EHS^{\pm})}{(S)}$$

$$(ES^-) = \frac{(EHS^{\pm})\, K_2'}{(H^+)}$$

$$(EH_2S^+) = \frac{(EHS^{\pm})(H^+)}{K_1'}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(EHS^{\pm})}{\frac{K_2 K_M}{(H^+)} \cdot \frac{(EHS^{\pm})}{(S)} + \frac{K_M(EHS^{\pm})}{(S)} + \frac{K_M (H^+)}{K_1} \cdot \frac{(EHS^{\pm})}{(S)} + \frac{K_2'}{(H^+)} (EHS^{\pm}) + (EHS^{\pm}) + \frac{(H^+)}{K_1'} (EHS^{\pm})}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{1}{\frac{K_M}{(S)} \left[1 + \frac{K_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K_1} \right] + 1 + \frac{K_2'}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K_1'}} .$$

En multipliant numérateur et dénominateur de cette expression par $\frac{(S)}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}}$, ce rapport devient :

$$\frac{v}{V_M} = \frac{\frac{1}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}}(S)}{(S) + K_M\left[\frac{1 + \frac{K_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K_1}}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}}\right]}$$

soit :

$$v = \frac{\frac{V_M}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}}(S)}{(S) + K_M\left[\frac{1 + \frac{K_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K_1}}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}}\right]}$$

en posant

$$V_M \text{ apparent} = V_M^{app} = \frac{V_M}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}}$$

et

$$K_M \text{ apparent} = K_M^{app} = K_M\left[\frac{1 + \frac{K_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K_1}}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}}\right].$$

L'expression ci-dessus devient une équation de vitesse michaelienne

$$v = \frac{V_M^{app}(S)}{S + K_M^{app}}.$$

Interprétation

- L'expression de V_M apparent,

$$V_M^{app} = \frac{V_M}{1 + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K'_1}} \qquad (1)$$

montre que cette grandeur dépend de V_M, activité au pH optimum de l'enzyme, et varie avec la concentration en ions H^+, donc varie avec le pH.

Afin de visualiser les variations de V_M^{app} en fonction du pH, représentons graphiquement la fonction $\frac{V_M^{app}}{V_M} = f(\text{pH})$ pour des valeurs choisies à titre d'exemple de $K'_1 = 10^{-4}$ ($pK'_1 = 4$) et $K'_2 = 10^{-8}$ ($pK'_2 = 8$).

En remplaçant dans (1) on obtient :

pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(H^+) en mol/l	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
V_M^{app}/V_M	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	0,09	0,5	0,91	0,98	0,91	0,5	0,09	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}

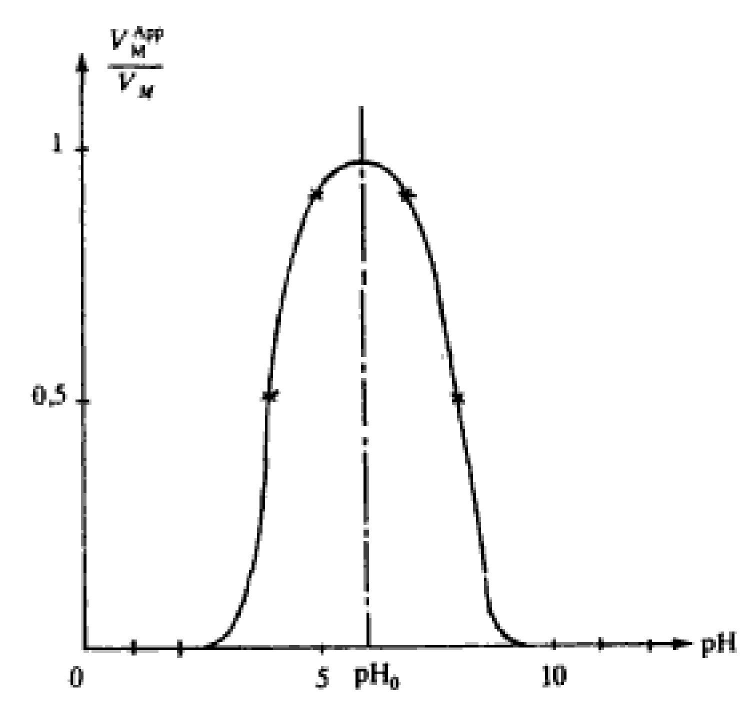


Figure 3.21 Courbe de variation de $\frac{V_M^{app}}{V_M}$ en fonction du pH.

La courbe représentant la variation de $\frac{V_M^{app}}{V_M}$ en fonction du pH est tout à fait semblable à la majorité des courbes expérimentales (fig. 3.21) ce qui prouve que la modélisation proposée est bonne, en tenant compte des approximations faites.

L'existence d'un pH_0 est liée à la présence de deux groupements d'atomes ionisables dans le site actif ; la courbe $\lg V_M^{app} = f(\text{pH})$ (fig. 3.22) montre comment on peut déterminer expérimentablement les pK de ces deux groupements.

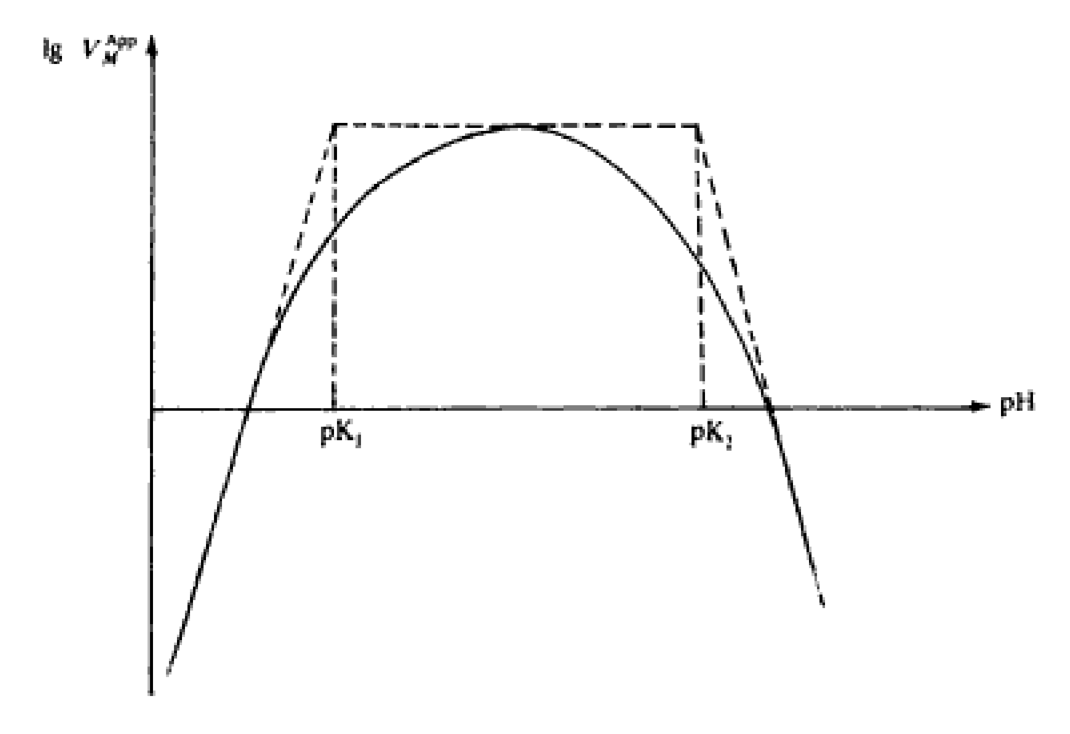


Figure 3.22 Courbe de variation de $\lg V_M^{app}$ en fonction du pH. La valeur des pK est donnée par l'abscisse des points d'intersection des trois tangentes.

- K_M^{app} dépend aussi du pH, comme le démontre la relation (2)

$$K_M^{app} = K_M \frac{1 + \dfrac{(H^+)}{K_1} + \dfrac{K_2}{(H^+)}}{1 + \dfrac{(H^+)}{K_1'} + \dfrac{K_2'}{(H^+)}} \qquad (2)$$

ce qui indique que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est fonction du pH, sauf dans le cas où $K_1 = K_1'$ et $K_2 = K_2'$; on a alors $K_M^{app} = K_M$.

F. Influence des ions minéraux

La plupart des enzymes sont sensibles à la présence de certains ions, mais ceci n'est souvent qu'un cas particulier de la notion « d'effecteur de l'activité enzymatique ».

Quelques enzymes sont activées par des anions (Cl^-) mais l'effet est généralement faible.

Les cations monovalents et divalents agissent sur l'activité enzymatique de nombreuses enzymes généralement en l'augmentant.

Ex. : Pour les kinases Mg^{2+} et K^+, pour la β-galactosidase Mg^{2+} et Na^+, pour la phosphatase alcaline Zn^{2+}.

Les cations lourds (Mg^{2+}, Pb^{2+}, etc.) dénaturant et précipitant les protéines détruisent l'activité enzymatique.

Selon les cas l'ion participe au phénomène catalytique en se combinant au substrat ou au complexe enzyme-substrat, on l'appelle alors coenzyme métallique ; souvent il stabilise la structure de la protéine enzymatique.

IV. LES EFFECTEURS DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

— Les ***effecteurs*** sont des substances chimiques qui modifient l'activité enzymatique. Ils sont répartis en deux groupes : les ***inhibiteurs*** qui diminuent cette activité et les ***activateurs*** qui l'augmentent. Si la plupart des effecteurs peuvent être répartis dans l'une ou l'autre de ces catégories, certains d'entre eux (cations en particulier) peuvent se comporter comme inhibiteurs ou activateurs selon les conditions de l'essai.

— *L'action d'un effecteur peut être primaire.* Il se combine alors soit avec l'enzyme (sur la fraction protéique, au niveau du site actif en réagissant avec un groupement actif ou à un autre niveau en modifiant la structure de la protéine) soit avec le coenzyme, soit avec le substrat, soit enfin avec le complexe enzyme-substrat. Dans quelques cas l'*action est secondaire* ; l'effecteur modifie l'activité en réagissant avec un activateur ou un inhibiteur présent dans le milieu.

Ex. : Les complexants, comme l'EDTA appartiennent à cette catégorie, ils chélatent des cations activateurs ou inhibiteurs (Ca^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, etc.).

— Le fluorure de sodium, en présence de phosphate, est un inhibiteur des enzymes activées par Mg^{2+} qu'il complexe sous forme de fluorophosphate de magnésium.

— Le mercaptoéthanol, la cystéine, le glutathion protègent les enzymes à groupements SH vis-à-vis d'inhibiteurs comme l'acide mono-iodacétique.

— *L'effet peut être réversible.* Indépendant du temps, il se manifeste dès que l'effecteur est ajouté et disparaît dès qu'il est éliminé. Ce mode d'action est étudié de façon analogue à la réaction enzymatique simple avec formation d'un complexe. Au contraire, *l'effet peut être irréversible,* s'accroître avec le temps de contact entre l'enzyme et l'effecteur et persister plus ou moins longtemps après l'élimination de ce dernier. En particulier on appelle inhibition une diminution d'activité réversible et inactivation une diminution d'activité irréversible.

— L'étude des effecteurs enzymatiques et de leur mode d'action est un problème complexe mais important, car il permet : d'interpréter leur rôle physiologique, d'étudier les mécanismes enzymatiques et d'éviter bien des erreurs dans les techniques enzymologiques.

Dans le cas le plus fréquent, celui d'une combinaison entre l'enzyme et l'effecteur, cette combinaison peut être indépendante du substrat ou pas.

A. L'inhibition

1. L'INHIBITEUR SE COMBINE AVEC L'ENZYME INDÉPENDAMMENT DU SUBSTRAT : INHIBITION NON COMPÉTITIVE

Il existe dans ce cas des sites indépendants pour le substrat S et pour l'inhibiteur I. L'enzyme totale E_T peut alors se présenter sous quatre formes : libre E et combinée ES, EI et ESI:

$$E_T = E + ES + EI + ESI \ .$$

La fixation de l'inhibiteur, indépendante du substrat, ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour ce dernier, la K_M de la réaction $S + E \rightleftarrows ES \rightarrow P + E$ ne varie donc pas.

Au cours du phénomène, il n'y a pas de compétition entre l'inhibiteur et le substrat pour se fixer sur l'enzyme : cette inhibition est ***non compétitive*** (fig. 3.23).

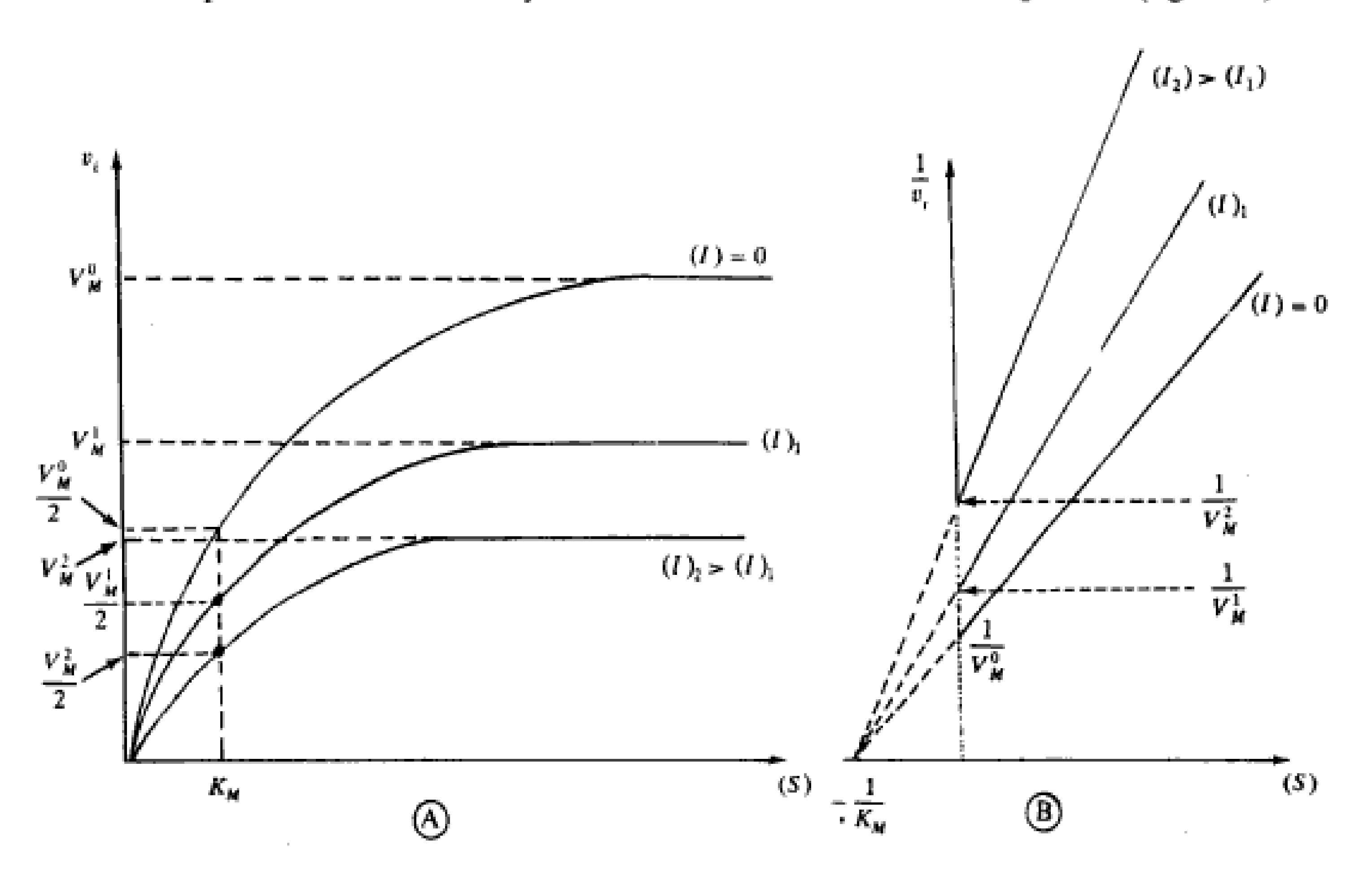


Figure 3.23 Inhibition non compétitive.

A. Représentation de Michaelis : V_M^{app} diminue quand (I) augmente, K_M est inchangée.
B. Représentation en coordonnées inverses.

Equation de vitesse

Le schéma réactionnel de l'inhibition non compétitive est :

$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad K_M = \frac{(E)(S)}{(ES)} \tag{1}$$

$$E + I \rightleftharpoons EI \qquad K_I = \frac{(E)(I)}{(EI)} \tag{2}$$

$$ES + I \rightleftharpoons ESI \qquad K_I = \frac{(ES)(I)}{(ESI)} \tag{3}$$

$$EI + S \rightleftharpoons ESI \qquad K_M = \frac{(EI)(S)}{(ESI)} \tag{4}$$

L'équation de conservation de l'enzyme s'écrit :

$$(E_T) = (E) + (EI) + (ESI) + (ES)$$

sachant que : $v = k_3(ES)$ et $V_M = k_3(E_T)$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(ET)} = \frac{(ES)}{(E) + (EI) + (ESI) + (ES)}$$

$$(E) = (ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} \qquad (EI) = (E)\frac{(I)}{K_I} = (ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} \cdot \frac{(I)}{K_I} \qquad (ESI) = (ES) \cdot \frac{(I)}{K_I}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(ES) + (ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} + \frac{K_M}{(S)} \cdot \frac{(I)}{K_I} \cdot (ES) + (ES) \cdot \frac{(I)}{K_I}}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{1}{1 + \frac{K_M}{(S)} + \frac{K_M}{(S)} \cdot \frac{(I)}{K_I} + \frac{(I)}{K_I}} = \frac{1}{\frac{K_M}{(S)}\left[1 + \frac{(I)}{K_I}\right] + \left[1 + \frac{(I)}{K_I}\right]}$$

$$\boxed{v = \frac{V_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}} \cdot \frac{(S)}{K_M + (S)}} \qquad \text{en posant} \qquad V_M^{app} = \frac{V_M}{\left[1 + \frac{(I)}{K_I}\right]}$$

$$\boxed{v = V_M^{app} \cdot \frac{(S)}{K_M + (S)}}$$

La fonction $v_i = f(S)$ est une relation michaelienne, la constante de Michaelis K_M est inchangée, l'activité apparente V_M^{app} est inférieure à V_M (fig. 3.23 Ⓐ).

Equation de vitesse en coordonnées inverses : (fig. 3.23 Ⓑ)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{\dfrac{V_M}{\left[1 + \dfrac{(I)}{K_I}\right]}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{\dfrac{V_M}{\left[1 + \dfrac{(I)}{K_I}\right]}} = \frac{K_M}{V_M^{app}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_M^{app}} .$$

2. L'INHIBITEUR ET LE SUBSTRAT NE SE COMBINENT PAS AVEC L'ENZYME DE FAÇON INDÉPENDANTE

Il faut ici distinguer deux cas :

a. L'inhibition compétitive

— *L'enzyme s'associe réversiblement au substrat ou à l'inhibiteur mais il n'y a pas de complexe ternaire.*

Il y a compétition pour l'occupation du site actif entre l'inhibiteur et le substrat, leurs combinaisons avec l'enzyme s'excluant mutuellement. L'enzyme totale se présente sous trois formes : enzyme libre et combinaisons ES ou EI :

$$E_T = E + ES + EI$$

Dans ce cas, l'affinité pour le substrat est modifiée par la présence de l'inhibiteur vis-à-vis duquel l'enzyme présente également de l'affinité, donc K_M varie, par contre il n'y a pas d'effet sur la vitesse maximum V_M, car lorsque (S) devient très grand, la vitesse est indépendante de (I) (par suite de la compétition) et tend vers V_M.

L'étude de nombreux cas d'inhibition compétitive a montré que, le plus souvent, les inhibiteurs compétitifs sont des ***analogues stériques*** du substrat, ce qui est une confirmation supplémentaire de la stéréospécificité des réactions enzymatiques.

L'exemple le plus classique est celui de l'inhibition de la respiration cellulaire par le malonate. L'une des étapes de cette respiration correspond à la déshydrogénation du succinate en fumarate qui est catalysée par la succinodéshydrogénase.

$COOH-CH_2-CH_2-COOH$ (acide succinique) → [E-FAD → E-FADH$_2$; succinodéshydrogénase] → $COOH-CH{=}CH-COOH$ (acide fumarique)

$COOH-CH_2-COOH$ (acide malonique (Inhibiteur compétitif))

L'enzyme est inhibée *compétitivement et électivement* par le malonate dont l'analogie structurale avec le succinate est évidente. En présence des deux composés, la succinodéshydrogénase « est trompée », elle fixe les deux mais ne peut en déshydrogéner qu'un seul, le succinate.

Ce mode d'inhibition présente un très grand intérêt tant pratique que théorique :

— Il met en évidence deux *stades indépendants* au cours de la réaction enzymatique, la fixation (du substrat ou de l'inhibiteur stériquement analogue) et la réaction catalytique (pour le substrat seulement). Ces deux étapes peuvent se dérouler sur des zones voisinés mais différentes de la structure tertiaire de la protéine, on distingue alors un site catalytique et un site de fixation (p. 36).

— La recherche systématique des analogues stériques d'un substrat qui sont inhibiteurs de l'enzyme permet de préciser les *éléments de la stéréospécificité* et parfois même le mode de fixation.

Ex. : Les élements de la stéréospécificité de la β-galactosidase (p. 31).

— Ces inhibiteurs permettent de *bloquer spécifiquement* certaines étapes du métabolisme, ce qui en facilite l'étude.

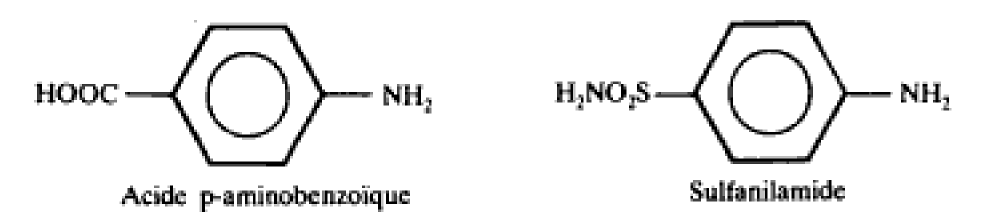
— Parmi les produits résultant d'une réaction enzymatique, l'un d'entre eux possède souvent une structure voisine du substrat, donc une affinité pour l'enzyme. Il peut devenir, en s'accumulant dans le milieu, un inhibiteur de la réaction.

Ex. : Le glucose est un inhibiteur des glucosidases, le galactose un inhibiteur des galactosidases.

— Les inhibiteurs compétitifs, analogues structuraux du substrat naturel, sont souvent appelés ***antimétabolites*** par suite de leur action de blocage spécifique, beaucoup d'*agents antibactériens* et de *substances pharmacologiques* appartiennent à ce groupe :

Ex. : Les dérivés d'ammonium quaternaire sont des antimétabolites de l'acétylcholine.

Les sulfamides sont des antimétabolites de l'acide *p*-aminobenzoïque qui entre dans la composition d'un coenzyme : l'acide folique lui-même facteur de croissance pour certaines bactéries.



Ils n'ont pas d'action sur l'homme, car celui-ci ne réalise pas la synthèse de l'acide folique qui est pour lui un facteur vitaminique.

Equation de vitesse :

Le schéma réactionnel de l'inhibition compétitive (fig. 3.24) est :

$$E + S \rightleftarrows ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad K_M = \frac{(E)(S)}{(ES)} \tag{1}$$

$$E + I \rightleftarrows EI \qquad KI = \frac{(E)(I)}{(EI)} \tag{2}$$

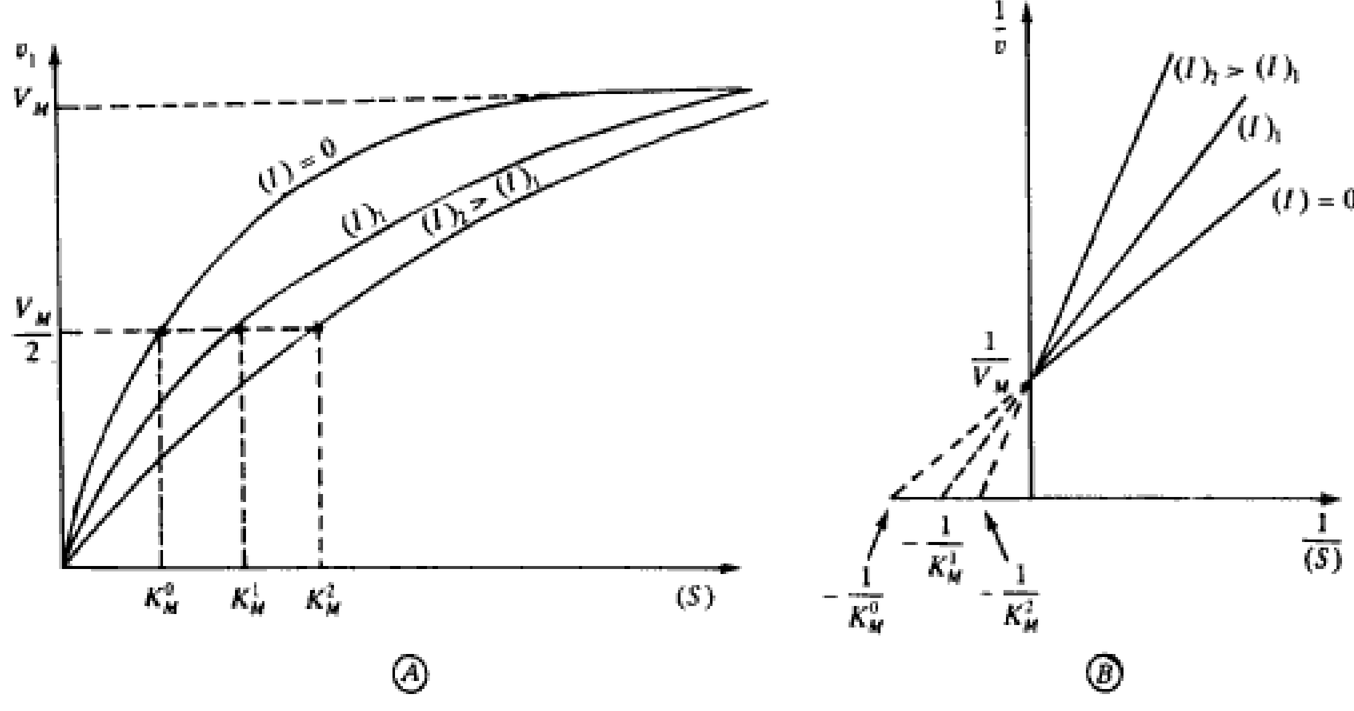


Figure 3.24 Inhibition compétitive.

A. Représentation de Michaelis ; K_M^{app} augmente quand (I) augmente, V_M est inchangé.
B. Représentation en coordonnées inverses.

L'équation de conservation de l'enzyme s'écrit :

$$(E_T) = (E) + (ES) + (EI)\,.$$

Sachant que $v = k_3(ES)$ et $V_M = k_3(E_T)$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(E_T)} = \frac{(ES)}{(E) + (ES) + (EI)}$$

$$(E) = \frac{K_M}{(S)} \cdot (ES) \qquad (EI) = (E) \cdot \frac{(I)}{K_I} = \frac{K_M}{(S)} \cdot \frac{(I)}{K_I} \cdot (ES)$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} + (ES) + (ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} \cdot \frac{(I)}{K_I}}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{1}{\frac{K_M}{(S)} + 1 + \frac{K_M}{(S)} \cdot \frac{(I)}{K_I}} = \frac{(S)}{K_M + (S) + K_M \frac{(I)}{K_I}}$$

$$v = V_M \frac{(S)}{K_M\left[1 + \frac{(I)}{K_I}\right] + (S)}$$

en posant $K_M^{app} = K_M\left[1 + \frac{(I)}{K_I}\right]$ on a :

$$v = V_M \frac{(S)}{K_M^{app} + (S)}$$

La fonction $v = f(S)$ est une relation michaelienne ; si (S) tend vers l'infini, v_i tend vers V_M, ce qui confirme que la présence d'un inhibiteur compétitif est sans effet sur V_M (fig. 3.24).

D'autre part, K_M apparent $= K_M^{app} = K_M\left[1 + \frac{(I)}{K_I}\right]$ est supérieure à K_M ($K_M^{app} > K_M$), ce qui correspond à une diminution apparente de l'affinité (fig. 3.23A).

Equation de vitesse en coordonnées inverses (fig. 3.23B)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_M}\left[1 + \frac{(I)}{K_I}\right] \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_M} = \frac{K_M^{app}}{V_M} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_M}.$$

• **Inhibition par excès de substrat**

L'inhibition par excès de substrat (fig. 3.25) est à rapprocher de cette forme d'inhibition. Dans ce cas le substrat par sa structure se combine à l'enzyme sur *deux ou plusieurs sites* comme cela se réalise lors de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase (fig. 3.24A). La fixation sur les deux sites d'une même molécule d'acétylcholine est indispensable, or, en présence d'un excès de substrat, il y a compétition et de nombreuses molécules de substrat ne sont fixées que sur un seul site. L'hydrolyse ne peut avoir lieu et la vitesse maximum de la réaction enzymatique

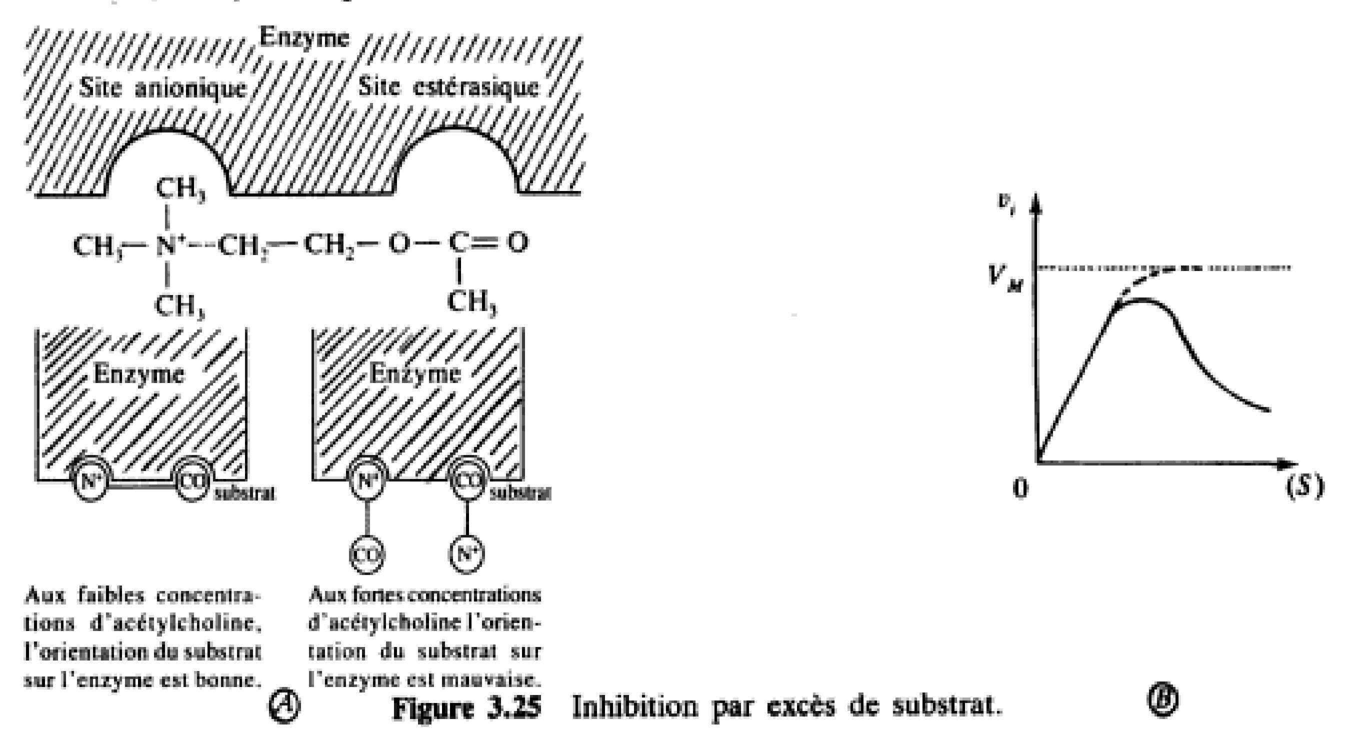


Figure 3.25 Inhibition par excès de substrat.

décroît rapidement, par suite de cette compétition par excès de substrat, comme le met en évidence la courbe B de la figure 3.25.

• **Equation de vitesse :**

Le schéma réactionnel de l'inhibition par excès de substrat est :

$$E + S \rightleftarrows ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad K_M = \frac{(E)(S)}{(ES)} \qquad (1)$$

$$ES + S \rightleftarrows ESS \qquad K_I = \frac{(ES)(S)}{(ESS)} \qquad (2)$$

L'équation de conservation de l'enzyme s'écrit :

$$(E_T) = (E) + (ES) + (ESS) .$$

sachant que $v = K_3(ES)$ et $V_M = k_3(E_T)$, on a :

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(E_T)} = \frac{(ES)}{(E) + (ES) + (ESS)}$$

$$(E) = (ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} \qquad (ESS) = (ES) \cdot \frac{(S)}{K_I}$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} + (ES) + (ES) \cdot \frac{(S)}{K_I}} = \frac{1}{\frac{K_M}{(S)} + 1 + \frac{(S)}{K_I}}$$

$$\boxed{v = \frac{V_M}{1 + \frac{K_M}{(S)} + \frac{(S)}{K_I}}} \qquad (3)$$

La fonction $v = f(S)$ n'est pas une relation michaelienne. Aux **faibles concentrations de substrat,** le terme $\frac{(S)}{K_I}$ est négligeable devant 1 et devant $\frac{K_M}{(S)}$ dans la relation (3), l'équation de vitesse devient

$$v = \frac{V_M}{1 + \frac{K_M}{(S)}} = V_M \frac{(S)}{K_M + (S)} .$$

L'équation de vitesse est michaelienne pour la partie I de la courbe A et pour la partie II de la courbe B de la figure 3.26.

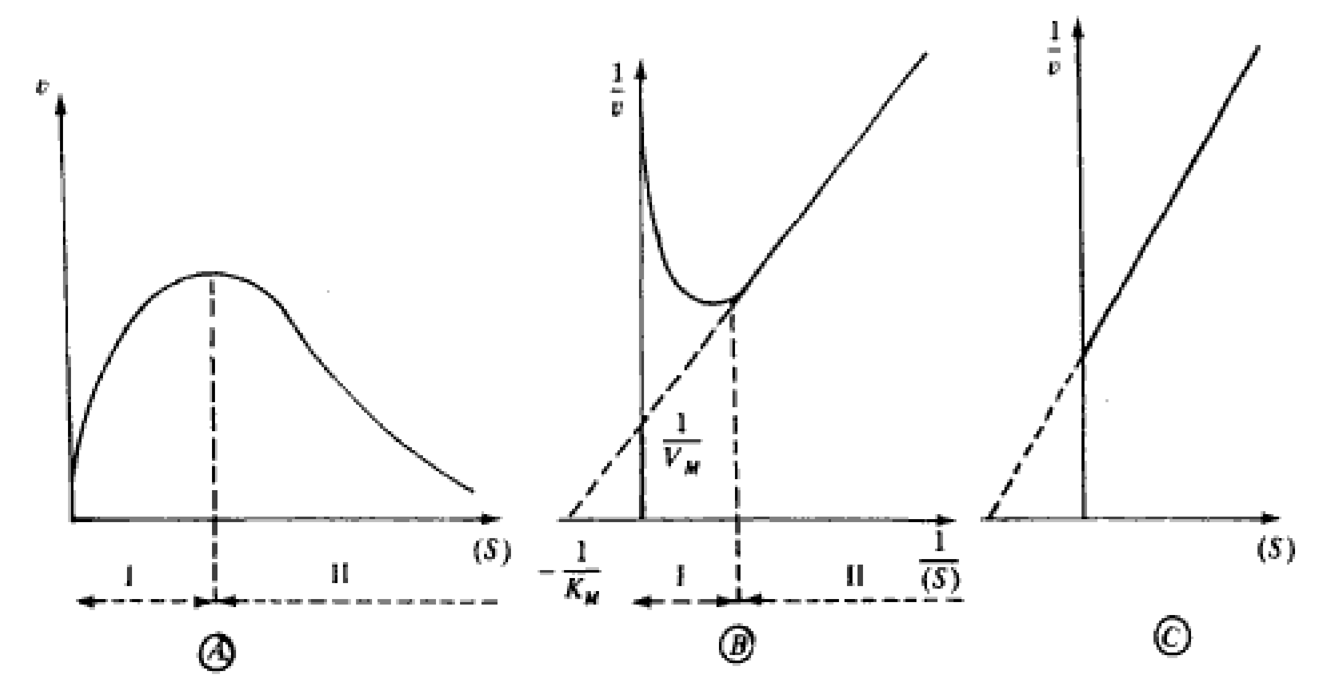


Figure 3.26 Inhibition par excès de substrat.
A. Représentation de Michaelis : $v = f(S)$.
B. Représentation en coordonnées inverses.
C. Représentation de la courbe $\frac{1}{v} = f(S)$ aux fortes concentrations de S.

Aux **fortes concentrations de substrat,** le terme $\frac{K_M}{(S)}$ est négligeable devant 1 et devant $\frac{(S)}{K_I}$ dans la relation (3), l'équation de vitesse devient :

$$v = \frac{V_M}{1 + \frac{(S)}{K_I}} \qquad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_M}\left[1 + \frac{(S)}{K_I}\right]$$

Elle est représentée graphiquement par la partie II de la courbe A et par la partie I de la courbe B de la figure 3.26. L'équation $\frac{1}{v} = f(S)$ (fig. 3.26.C) est représentée par une droite qui permet la détermination graphique de K_I

b. L'inhibition incompétitive

— *Le phénomène est séquencé, l'inhibiteur ne s'associe qu'une fois le complexe enzyme-substrat formé et le complexe ternaire obtenu est inactif.*

Equation de vitesse :

Le schéma réactionnel de l'inhibition incompétitive est :

$$E + S \rightleftarrows ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad K_M = \frac{(E)(S)}{(ES)} \qquad (1)$$

$$ES + I \rightleftarrows ESI \qquad K_I = \frac{(ES)(I)}{(ESI)} \qquad (2)$$

L'équation de conservation de l'enzyme s'écrit :

$$(E_T) = (E) + (ES) + (ESI)$$

sachant que $v_i = k_3(ES)$ et $V_M = k_3(E_T)$ on a :

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(E_T)} = \frac{(ES)}{(E) + (ES) + (ESI)}$$

$$(E) = \frac{K_M \cdot (ES)}{(S)} \qquad (ESI) = \frac{(I)}{K_I} \cdot (ES)$$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{(ES)}{(ES) \cdot \frac{K_M}{(S)} + (ES) + (ES) \cdot \frac{(I)}{K_I}} = \frac{1}{1 + \frac{K_M}{(S)} + \frac{(I)}{K_I}}$$

en multipliant numérateur et dénominateur par $\frac{(S)}{1 + \frac{(I)}{K_I}}$, l'équation de vitesse s'écrit :

$$v = \frac{V_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}} \cdot \frac{(S)}{\frac{(S)}{1 + \frac{(I)}{K_I}} + \frac{K_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}} + \frac{(I)}{K_I} \cdot \frac{(S)}{1 + \frac{(I)}{K_I}}}$$

$$v = \frac{V_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}} \cdot \frac{(S)}{\frac{(S)}{1 + \frac{(I)}{K_I}} \left(1 + \frac{(I)}{K_I}\right) + \frac{K_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}}}$$

$$\boxed{v = \frac{V_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}} \cdot \frac{(S)}{\frac{K_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}} + (S)}}$$

En posant :

$$V_M^{app} = \frac{V_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}} \quad \text{et} \quad K_M^{app} = \frac{K_M}{1 + \frac{(I)}{K_I}}.$$

L'équation devient :

$$\boxed{v = V_M^{app} \cdot \frac{(S)}{K_M^{app} + (S)}}$$

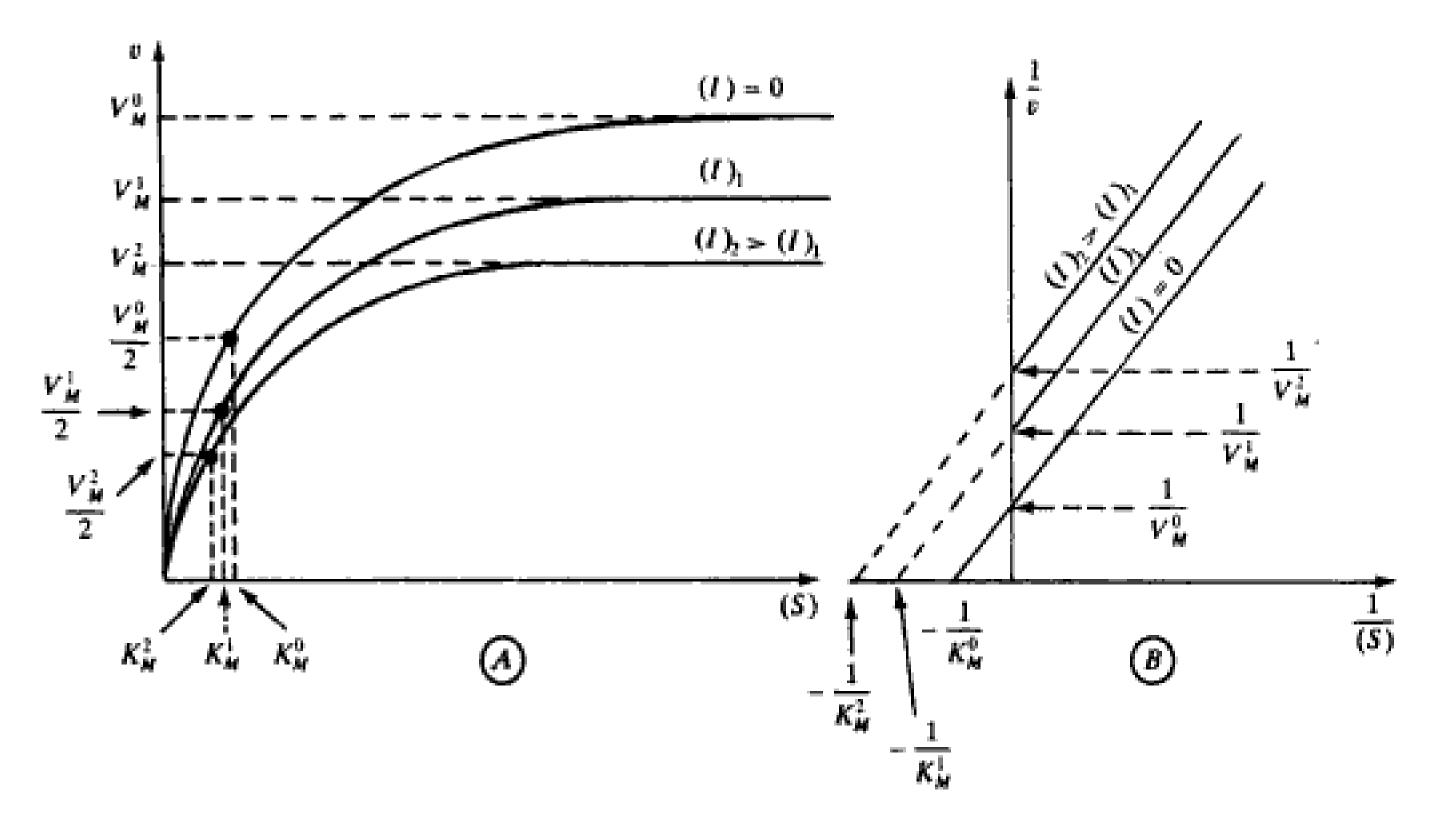


Figure 3.27 Inhibition incompétitive.

A. Représentation de Michaelis : K_M^{app} et V_M^{app} diminuent quand (I) augmente.
B. Représentation en coordonnées inverses.

L'activité apparente V_M^{app} est inférieure à l'activité V_M, la constante de Michaelis apparente K_M^{app} est inférieure à K_M (fig. 3.27A). Tout se passe comme si la fixation de l'inhibiteur diminuait l'activité apparente de l'enzyme et favorisait la stabilité du complexe *ES*.

Equation de vitesse en coordonnées inverses : (fig. 3.27B)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_M} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{\dfrac{V_M}{1 + \dfrac{(I)}{K_I}}} = \frac{K_M}{V_M} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_M^{app}}$$

3. CONTRIBUTION DES INHIBITEURS À LA DÉTERMINATION DES MÉCANISMES RÉACTIONNELS

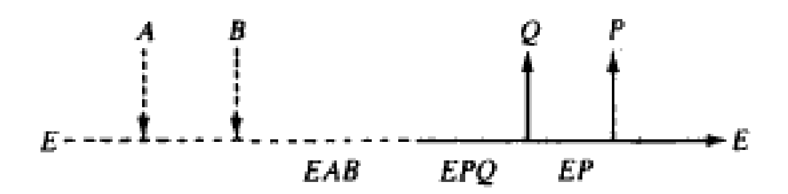
L'exploitation des études expérimentales des inhibitions peut contribuer à élucider certains mécanismes réactionnels.

- **1er exemple**

Considérons la réaction enzymatique :

$$A + B \overset{E}{\rightleftarrows} P + Q$$

Si le produit P est inhibiteur compétitif de l'enzyme E, on peut dire qu'il quitte l'enzyme après Q ; sans préjuger du mécanisme de formation du complexe EPQ, on peut écrire selon Cleland :



• **2ᵉ exemple :**

Si l'on considère le même type de réaction :

$$A + B \overset{E}{\rightleftarrows} P + Q$$

A l'aide d'une première étude cinétique, on démontre que B', analogue structural de B est inhibiteur compétitif de l'enzyme E ; on opère avec une concentration de substrat (A) constante et une concentration de substrat (B) variable, en présence et en absence de B' (fig. 3.28).

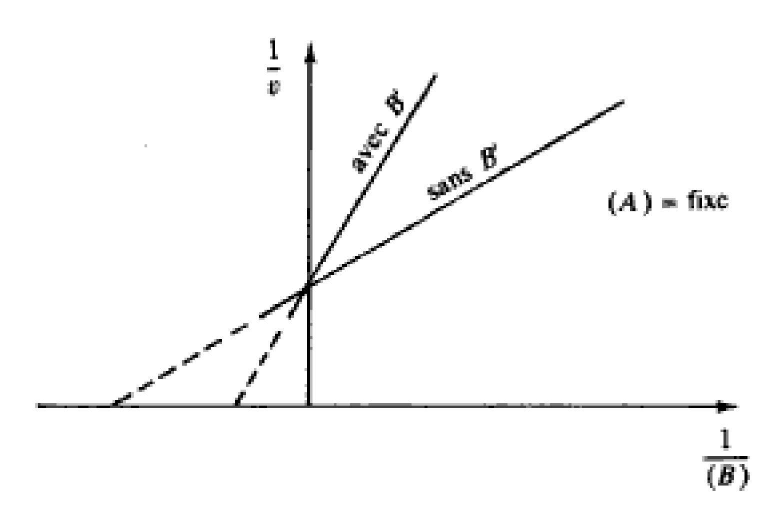


Figure 3.28 Représentation en coordonnées inverses d'une cinétique à deux substrats : (A) fixe, (B) variable, avec et sans un analogue structural B' de B.

Puis on réalise une seconde expérience avec une concentration de substrat (B) fixe, et une concentration de substrat (A) variable, en présence et en absence de B' ; plusieurs résultats sont possibles.

Si B' est inhibiteur non compétitif, B' et A se fixent sur l'enzyme sur deux sites différents, il en est donc de même pour A et B. Un mécanisme aléatoire est donc probable (fig. 3.29A).

Si B' est inhibiteur incompétitif, on en conclut que B' se fixe sur le complexe EA, on est donc en présence d'un mécanisme séquencé (fig. 3.29B).

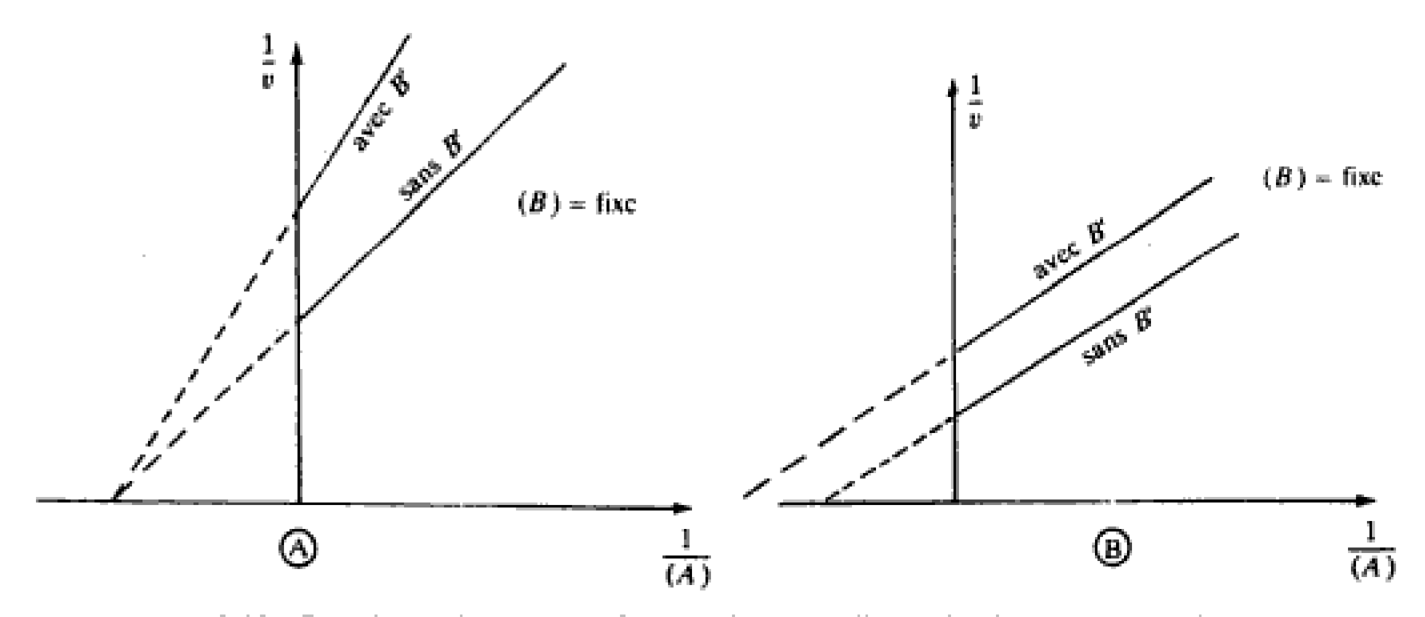


Figure 3.29 Représentation en coordonnées inverses d'une cinétique à deux substrats : (B) fixe, (A) variable avec et sans B', analogue structural de B.

B. L'activation

Les activateurs sont des molécules ou des ions qui s'associent à l'enzyme ou au complexe ES, qui ont pour effet d'augmenter la vitesse des réactions enzymatiques.

Parmi les activateurs que l'on rencontre fréquemment, il y a les cations métalliques.

Si l'on considère seulement les activateurs capables de former des associations réversibles, plusieurs modes d'association peuvent être envisagés ; par exemple : association au hasard (fig. 3.30) :

$$E \rightleftarrows ES \rightleftarrows ESA \rightarrow E + P + A, \quad E \rightleftarrows EA \rightleftarrows ESA$$

ou association selon un mécanisme séquencé.

$$E + S \rightleftarrows ES$$
$$ES + A \rightleftarrows ESA \rightarrow E + P + A\,.$$

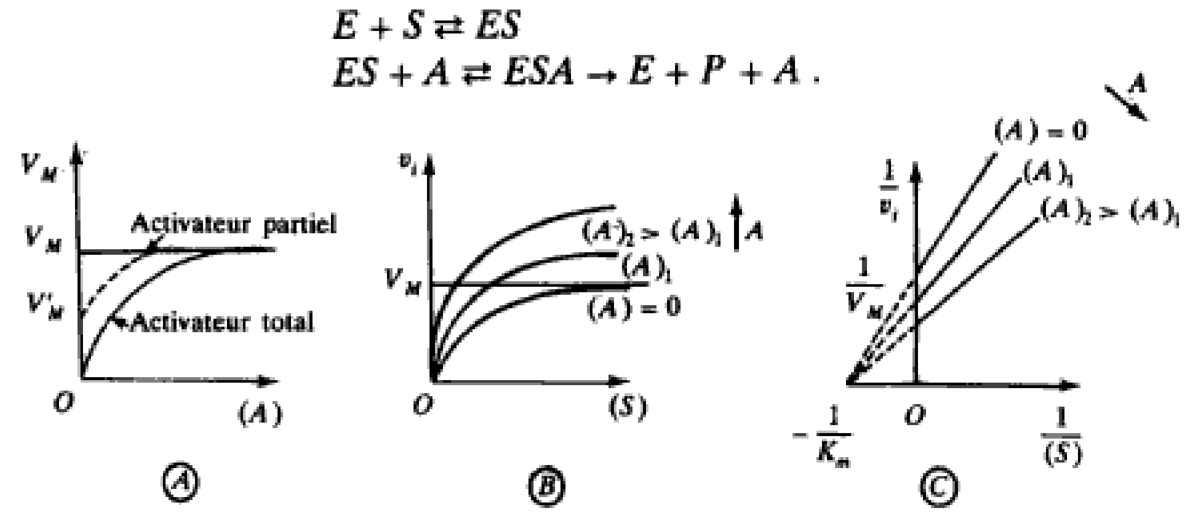


Figure 3.30 Activation par combinaisons indépendantes (association au hasard).

C. Les enzymes allostériques. Les effecteurs allostériques

Les enzymes allostériques présentent un certain nombre de caractéristiques structurales et cinétiques.

1. CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES

Les enzymes allostériques sont de type oligomérique, ce qui signifie qu'elles sont constituées de sous-unités appelées protomères, en nombre variable (2, 4 ou 6... plus rarement 3).

Plusieurs modèles ont été proposés, selon l'hypothèse de Monod, Wyman et Changeux, les protomères sont associés de sorte que la molécule possède au moins un axe de symétrie, chaque sous-unité possède un seul site de fixation pour le substrat, les sites sont symétriques entre eux.

La molécule peut, au cours d'une transformation réversible, passer d'un état conformationnel à un autre, cette transition entraîne un léger déplacement des protomères.

L'affinité de l'enzyme pour le substrat est différente pour les deux états de conformation, l'un est favorable, l'autre pas.

L'hémoglobine n'est pas une enzyme mais peut cependant servir de modèle d'étude, elle est formée de quatre sous-unités et le passage $Hb(O_2)_4 \rightarrow Hb$ s'accompagne d'une déformation de la molécule (*).

2. CARACTÉRISTIQUES CINÉTIQUES

Les enzymes allostériques peuvent présenter une cinétique différente, la courbe $v_i = f(S)$ n'est pas hyperbolique comme le prévoit l'équation de Michaelis-Menten, mais sigmoïdale. En coordonnées inverses, la relation n'est plus linéaire (fig. 3.31).

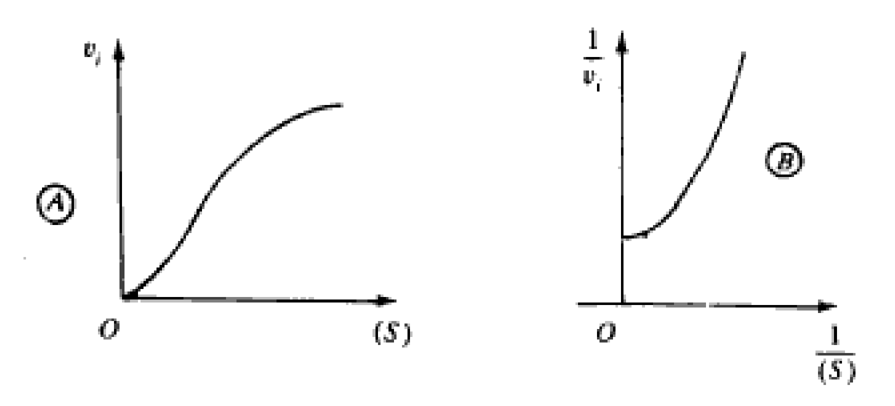


Figure 3.31 Cinétique d'une enzyme allostérique (cas général).

(*) Consulter : Biochimie structurale de C. Audigié et F. Zonszain p. 130.

Cette courbe rend compte de *l'effet coopératif*, que l'on peut définir de la façon suivante : la fixation d'une première molécule de substrat facilite la fixation des suivantes.

L'activité enzymatique devient très sensible aux variations de concentration à partir d'un seuil, ce qui permet une régulation.

En reprenant l'exemple de l'hémoglobine, la fixation de l'oxygène témoigne d'une coopérativité qui se traduit par le caractère sigmoïdal de la courbe de saturation de l'hémoglobine par l'oxygène (fig. 3.32).

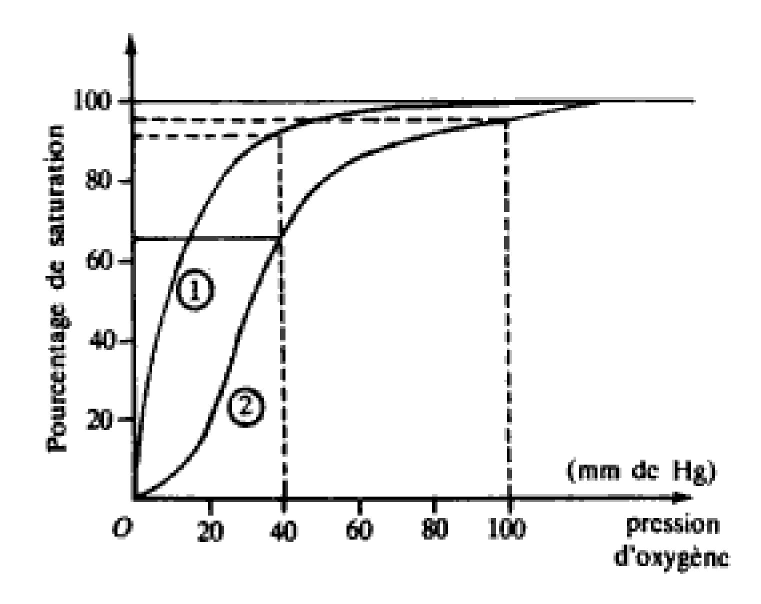


Figure 3.32 Courbes de saturation par l'oxygène ; 1. de la myoglobine (protéine monomérique) ; 2. de l'hémoglobine (protéine tétramérique).

Cette courbe représente la relation empirique :

$$y = 100 \times \frac{K \times p^n}{1 + K \times p^n}$$

dans laquelle y est le pourcentage de saturation, K la constante d'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, P la pression partielle d'O_2 et n l'état d'agrégation des chaînes (pour Hb, $n = 2,8$).

En raisonnant par analogie, on peut écrire une équation approximative rendant compte de la variation de v en fonction de (S), pour cela on remplace y par $\frac{v}{V_M}$ (si $v = 0$, cela correspond à $y = 0$ % de saturation ; si $v = V_M$, cela correspond à $y = 100$ % de saturation).

On pose $K' = \frac{1}{K}$ et on remplace p par (S).

On obtient une équation de type :

$$v = V_M \frac{(S)^n}{K' + (S)_n}$$

dans laquelle n est un exposant qui rend compte de l'interaction entre les sites de l'enzyme, on a $1 < n < N$ (N représente le nombre de sous-unités dans l'oligomère).

Si $n = 1$, l'interaction entre les sous-unités est nulle, la cinétique est michaelienne, les monomères agissent de façon indépendante ; plus n tend vers N et plus l'effet de coopérativité est important.

Par quel mécanisme moléculaire peut-on expliquer la coopérativité ?

Faisons le bilan des données :

— les N protomères de l'oligomère étant identiques, on peut raisonnablement supposer qu'en absence du substrat ils possèdent la même affinité pour S (tout ceci reste formel, puisque l'on ne voit pas comment on mesurait cette grandeur sans substrat), c'est donc la fixation de la première molécule de S qui va déclencher une modification de la constante d'affinité de E vis-à-vis de S ;

— la fixation d'une molécule de S sur un protomère va induire une transition, c'est-à-dire un changement de conformation qui modifiera l'affinité du site de ce protomère vis-à-vis de S (effet homotrope) ;

— la transmission de la modification de l'affinité pour S d'un site à un autre se fait par les protéines des monomères ;

— l'enzyme existe sous deux états conformationnels : l'un, l'état R, représente la forme active de l'enzyme, l'état de forte affinité pour le substrat ; l'autre, l'état T, représente la forme peu active, celle de faible affinité (fig. 3.33).

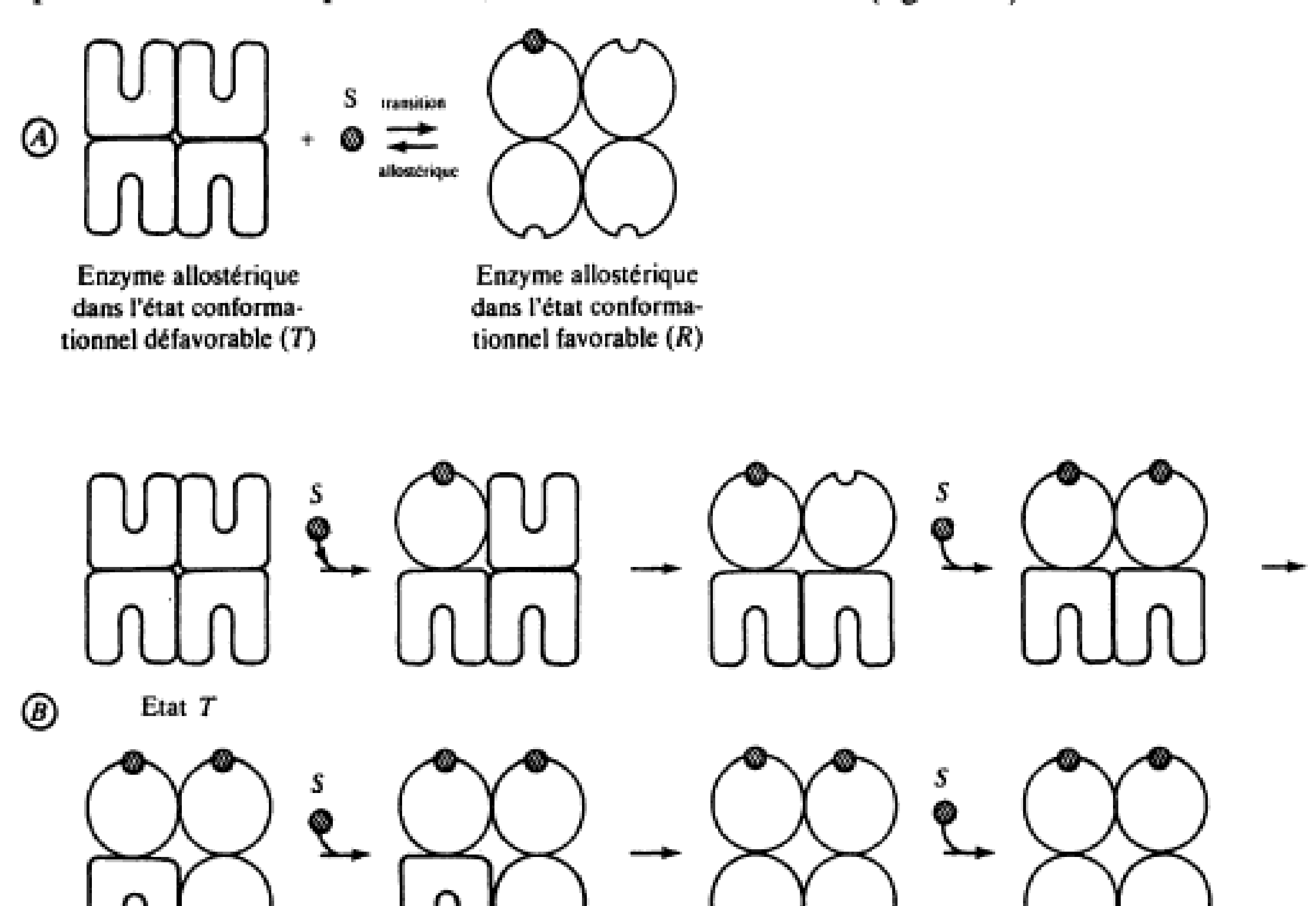


Figure 3.33 Effet allostérique homotrope : effet coopératif.

A. Hypothèse de Monod, Wyman et Changeux.

B. Hypothèse de Koshland.

Deux hypothèses rendent compte du mécanisme au niveau moléculaire, sans qu'on puisse dire laquelle prévaut sur l'autre, la réalité étant probablement plus complexe et, selon les circonstances, représentée de façon restrictive par l'une ou l'autre.

Selon la théorie de Monod, Wyman et Changeux, les *N* protomères de l'oligomère changent de conformation ensemble, la superstructure conserve en permanence une disposition symétrique, il n'existe pas d'espèce hybride possédant à la fois des sous-unités dans l'état *T* et des sous-unités dans l'état *R*.

Au contraire, la théorie de Koshland décrit un mécanisme au cours duquel la transconformation se fait progressivement, de sous-unité en sous-unité (fig. 3.33).

3. LES EFFECTEURS ALLOSTÉRIQUES

C'est la caractéristique essentielle de ces enzymes, les *effecteurs allostériques sont stéréospécifiques* mais ne sont pas des analogues stériques du substrat.

Ex. : La L-thréonine-déshydrogénase, première enzyme intervenant dans la synthèse de l'isoleucine, est inhibée spécifiquement par la L-isoleucine (l'isomère D ou les autres amino-acides sont sans action) et activée spécifiquement par la L-valine. Or, une simple observation des formules montre qu'il n'y a aucune analogie structurale entre ces deux acides aminés et la L-thréonine qui est le substrat.

Le fait que l'effecteur ne soit pas un analogue stérique du substrat l'a fait qualifier d'effecteur allostérique et par généralisation on parle de site allostérique et d'enzyme ou de protéine allostérique.

Les effecteurs allostériques, appelés aussi modulateurs allostériques sont à l'origine des effets hétérotropes, c'est-à-dire des effets entre sites différents (sites catalytiques et sites régulateurs) qui peuvent être coopératifs donc à l'origine d'une activation ou d'une inhibition (fig. 3.34).

Il est possible de définir deux catégories d'enzymes allostériques.

— Les enzymes allostériques de type *K* pour lesquels, en l'absence de substrat, l'état de faible affinité prédomine.

— Les enzymes allostériques de type *V* chez lesquels les deux états de l'enzyme allostérique ont la même affinité pour le substrat. Dans ce cas un effecteur ne peut avoir d'effet sur la réaction enzymatique que si les deux états se différencient par leur activité catalytique. Suivant l'affinité de l'effecteur pour l'état actif ou inactif il se comportera comme un activateur ou un inhibiteur : K_M ne sera pas affecté seul V_M variera (fig. 3.35).

Nous verrons l'intérêt qu'apporte cette régulation de l'activité pour l'évolution du métabolisme intermédiaire.

(A)

S

Etat conformationnel défavorable (T)

Etat conformationnel favorable (R)

v_i

(S)

(B)

I

Site inhibiteur vacant

Etat conformationnel favorable (R)

Etat conformationnel défavorable (T)

v_i

$\frac{V_M}{2}$

1 2

K_M^1 K_M^2 (S)

(C)

A

Site activateur vacant

Etat conformationnel défavorable (T)

Etat conformationnel favorable (R)

v_i

V_M

$\frac{V_M}{2}$

3 2 1

K_M^3 K_M^2 K_M^1 (S)

Figure 3.34 Effets allostériques homotrope et hétérotropes pour une enzyme dimérique.

A. Effet allostérique homotrope (effet coopératif).
B. Effet allostérique hétérotrope : inhibition d'une enzyme du système K :
 courbe 1 : sans inhibiteur
 courbe 2 : avec inhibiteur
C. Effet allostérique hétérotrope : activation d'une enzyme du système K :
 courbe 1 : sans activateur
 courbe 2 : avec activateur
 courbe 3 : avec activateur à saturation, la cinétique et michaélienne.

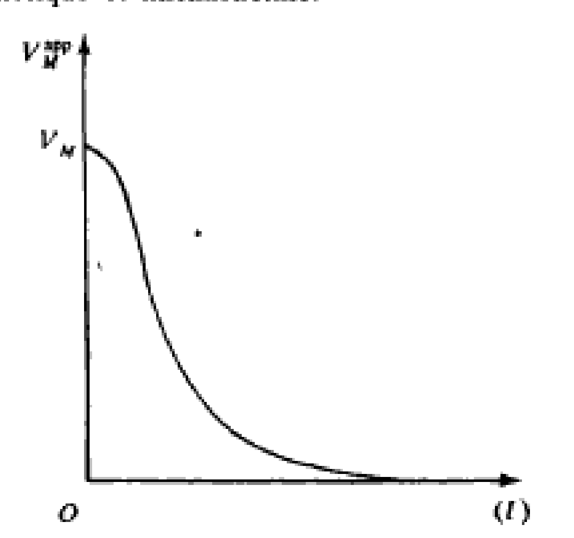


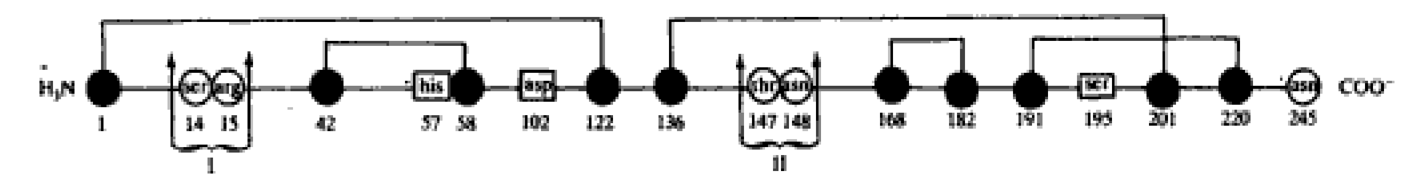
Figure 3.35 Inhibition allostérique pour une enzyme de type V.

V. MÉCANISME DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE

Les résultats actuels sont fragmentaires ; si le substrat et les produits de la réaction sont connus, la structure précise du site actif (nature des résidus d'aminoacides, orientation de ces résidus, c'est-à-dire structures secondaire et tertiaire) et les étapes intermédiaires ne le sont pas toujours. Ce site actif pour le substrat, qui peut être simple ou plus complexe (site double pour certains substrats, sites de fixation et catalytique différents, sites pour le substrat et pour le coenzyme, éventuellement pour les ions minéraux), est parfois masqué dans la protéine. On parle alors de *précurseur ou zymogène ou proenzyme* pour cette forme inactive, et l'activation qui correspond au démasquage, ou à la modification du site actif, est réalisée par une protéolyse partielle qui élimine une partie de la structure peptidique.

Ex. : Le trypsinogène, formé par une seule chaîne polypeptidique de 229 résidus dont la séquence est connue, est hydrolysé en présence d'entérokinase au niveau de la sixième liaison peptidique du côté *N* terminal pour former la trypsine active et un hexapeptide : Val-$(Asp)_4$-Lys.

— De même l'activation de l'α-chymotrypsinogène correspond à des protéolyses partielles permettant une modification de la structure tertiaire aboutissant à la constitution d'un centre actif de structure stérique et chimique (résidus d'aminoacides) définie (fig. 3.36 et 3.37).



Caractéristiques de la structure primaire de l'α-chymotrypsinogène de bœuf

⌐ pont disulfure (résidus de cystéine).

□ résidus participant au site actif de l'α-chymotrypsine.

I, II protéolyses partielles lors de l'activation en α-chymotrypsine.

Ces protéolyses partielles amènent un remaniement de la chaîne peptidique ayant pour conséquences un regroupement et une orientation particulière de certains résidus (sérine et histidine en particulier) pour constituer le site actif de l'enzyme.

La structure du ***site actif*** est connue pour certaines enzymes (fig. 3.38). Nous retiendrons que généralement *plusieurs secteurs de la structure primaire*, rapprochés et orientés par les replis des structures secondaire et tertiaire, y participent et que les *résidus de l'histidine, de la sérine, de la cystéine, de la lysine* ou les groupements carboxyliques des *acides aspartique et glutamique* sont très souvent présents. Ces aminoacides présentent chacun des particularités (imidazole riche en électrons π pour l'histidine, groupement polaire hydroxyle pour la sérine, groupement thiol pour la cystéine, groupements dissociables COO^- ou NH_3^+ pour les acides aminés

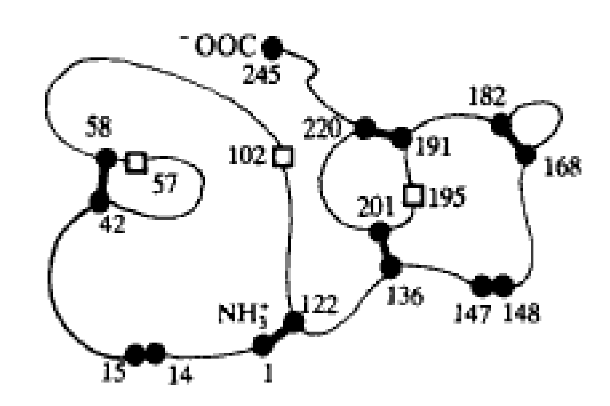


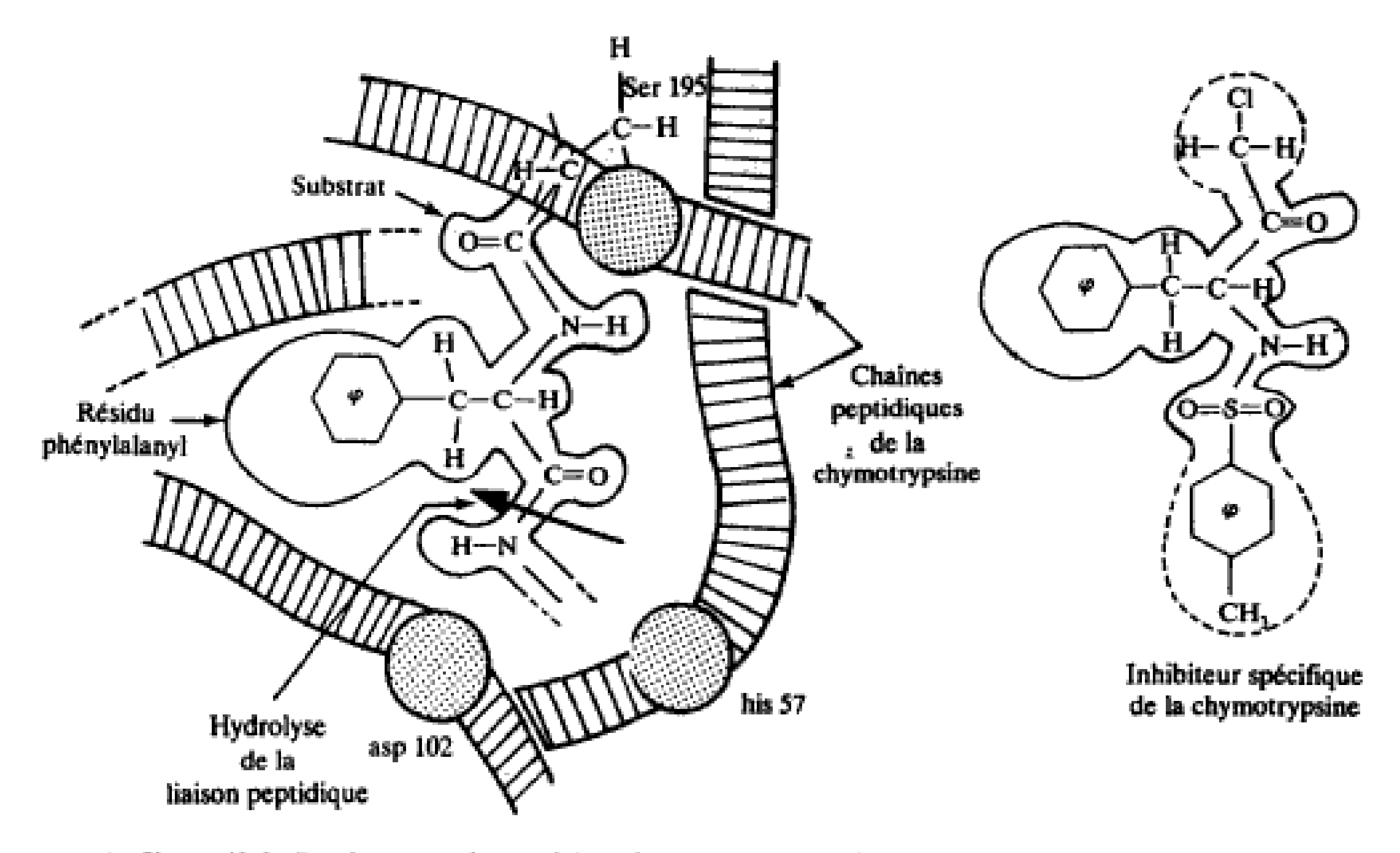
Figure 3.36 L'α-chymotrypsinogène de bœuf.

Chaine *A* Chaine *B* Chaine *C*

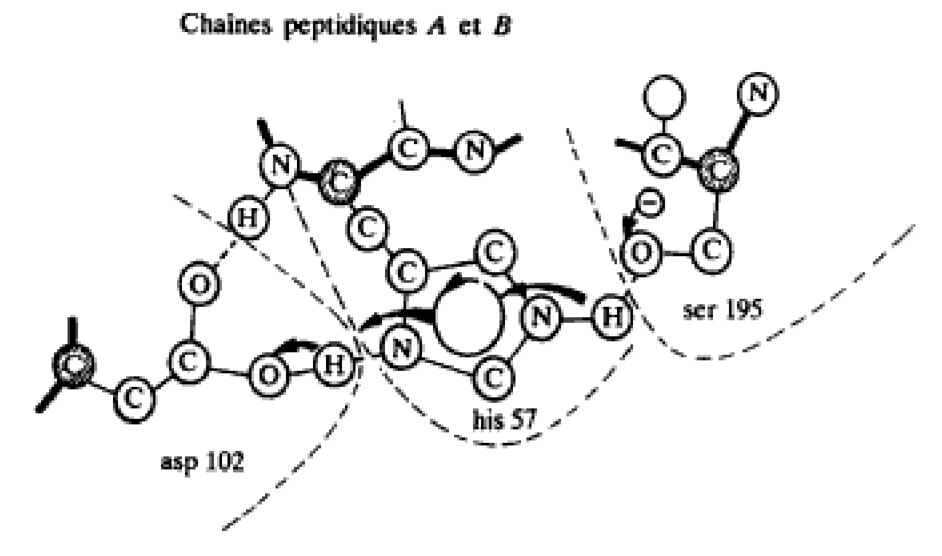
Figure 3.37 Structure tertiaire de l'α-chymotrypsine de bœuf.

dicarboxyliques et la lysine) ainsi que des inhibiteurs spécifiques intéressants pour l'étude des mécanismes.

Ex. : Le groupement thiol présent dans les enzymes dites « à SH » est bloqué par l'acide iodo-acétique, l'hydroxyle de la sérine est bloqué par estérification avec le di-isopropyl-fluorophosphate.



A. Site actif de l'α chymotrypsine : schéma de sa structure stérique à l'origine de la stéréospécificité.



***B*. Site actif de l'α chymotrypsine : schéma de sa structure chimique. Influence des résidus asp 102 et his 57 sur le résidu ser 195 : apparition d'une charge négative par labilisation d'un proton.**

Figure 3.38 Site actif de l'α-chymotrypsine.

Au cours de la réaction enzymatique l'enzyme accomplit les fonctions :

• de *réacteur*, en extrayant les réactifs (substrat, coenzyme, activateurs) du milieu pour les regrouper dans des proportions convenables et les orienter de façon favorable. L'association enzyme-substrat stéréospécifique qui précède l'acte catalytique est un phénomène exergonique, donc spontané. L'étude énergétique a conduit à admettre qu'il se produit des modifications de conformation dans la molécule

d'enzyme ou dans celle de substrat lors de la formation de ce complexe. Selon les théories il y aurait :

— distorsion du substrat ayant pour effet de labiliser certaines de ses liaisons (théories du « rack » de Lumry). L'enzyme est alors considérée comme rigide ;

— des changements de conformation de l'enzyme ayant pour conséquence des contraintes dans le substrat (théorie du strain). Ce dernier serait alors dans un état proche de l'état activé ;

— un ajustement induit de l'enzyme et du substrat (théorie de Koshland) contribuant à rendre l'orientation du substrat par rapport aux groupes catalytiques de l'enzyme plus favorable.

• de *catalyseur,* en abaissant la barrière énergétique, le plus souvent en multipliant les intermédiaires dans le chemin de la réaction (fig. 3.39). Dans cette catalyse intramoléculaire, l'environnement protéique par ses groupements fonctionnels polaires ou apolaires, sa densité en électrons π et généralement la présence de coenzyme et de cations, etc. sont à l'origine de ces états de transition particuliers.

• d'*intermédiaire,* en acceptant transitoirement les radicaux transférés.

L'ensemble de ces possibilités est toujours dominé par la notion de structure protéique à l'origine de la spécificité stérique. Le détail des mécanismes est connu de façon approfondie dans certains cas (fig. 3.39).

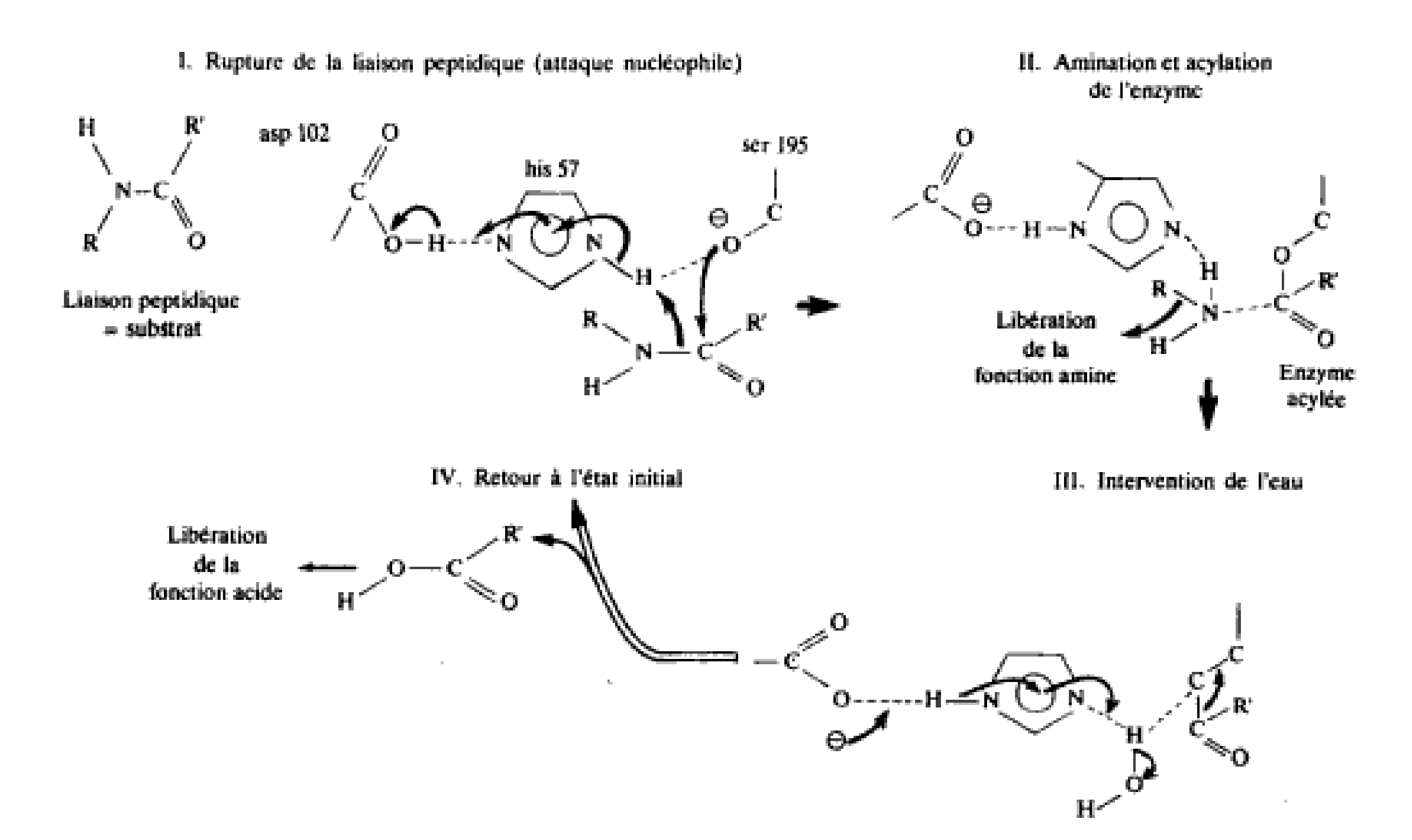


Figure 3.39 Mécanisme d'action proposé pour le centre actif de l'α-chymotrypsine (d'après R. E. Dickerson et Geis).

VI. CLASSIFICATION DES ENZYMES

Le grand nombre d'enzymes actuellement connues par suite du développement rapide de l'enzymologie crée de nombreux problèmes de terminologie et de classification.

Pour la terminologie, on distingue :

— des *dénominations anciennes* telles que pepsine, trypsine, etc. ;

— une nomenclature dans laquelle on ajoute le suffixe « ***ase*** » soit au *substrat* (uréase, phosphatase, arginase), soit au *type de réaction chimique* qui est catalysée (hydrolases, oxydases, isomérases) ;

— une *nomenclature officielle* rigoureuse mais complexe.

Chaque enzyme porte un numéro d'ordre à 4 chiffres séparés par des points.

Le premier chiffre précise la classe : ***Ex.*** : oxydoréductases. *Le second* la sous-classe qui indique pour les oxydoréductases la nature du groupe du donneur qui est l'objet de l'oxydation.

Ex. : sous-classe 1 : donneur = CH—OH.

Le troisième indique la sous-sous-classe. Dans le cas des oxydoréductases il s'agit du type d'accepteur.

Ex. : sous-sous-classe 1 : accepteur = NAD^+ ou $NADP^+$.

Le dernier chiffre représente le numéro d'ordre de l'enzyme dans la sous-sous-classe considérée.

Ex. : la lactate déshydrogénase ou L-lactate : NAD^+ oxydoréductase, qui catalyse la réaction :

$$\text{L-lactate} + NAD^+ \rightleftarrows \text{pyruvate} + NADH + H^+$$

porte le numéro 1.1.1.27.

— L'oxydase du lactate ou L-lactate : oxygène oxydoréductase, qui catalyse la réaction :

$$\text{L-lactate} + O_2 \rightleftarrows \text{acétate} + CO_2 + H_2O_2$$

porte le numéro 1.1.3.2.

Pour la classification, nous retiendrons six catégories selon les fonctions des enzymes.

• **Les oxydoréductases :** Il s'agit d'enzymes transférant des électrons seuls ou des électrons accompagnés de protons (élément H). Elles agissent sur les groupements CH—OH, CH—CH, CH—NH_2, etc., en présence d'un coenzyme ou d'oxygène.

• **Les transférases** qui catalysent les transferts d'un groupe d'une molécule à une autre molécule sont subdivisées d'après la nature du groupe transféré. Il peut

s'agir d'unités à un carbone : méthyle, carboxyle, amidino, hydroxyméthyle ; d'un résidu aldéhydique ou cétonique ; d'un radical, acyle, alkyle, glycosyle, phosphoryle, etc.

• **Les hydrolases :** Elles catalysent l'hydrolyse de diverses liaisons : liaisons ester (estérases, lipases, phosphatases), liaisons glycosidiques et *N* glycosidiques (amylases, galactosidases, nucléosidases), liaisons peptidiques (protéases, peptidases).

• **Les lyases :** Ce sont des enzymes qui catalysent le déplacement d'un groupe à partir d'un substrat avec formation sur celui-ci d'une double liaison (C=C, C=0, C=N).

Ex. : C—C lyases (carboxylyases, aldéhydelyases),

C—O, C=O lyases (hydrolyases) .

• **Les isomérases** qui catalysent des inversions de configurations stériques.

Ex. : Epimérases, racémases, cis-trans-isomérases.

• **Les ligases ou synthétases :** Elles prennent part aux réactions de synthèse des constituants cellulaires par la formation de liaisons C—C, C—O, C—S, C—N. En général leur action nécessite de l'énergie qui est fournie par l'ATP.

Ex. : La succinyl-CoA synthétase.

VII. LES COENZYMES

La plupart des enzymes, à l'exception essentiellement des hydrolases, requièrent pour leur fonctionnement la présence absolue d'un coenzyme. Si l'on a actuellement identifié plus de mille enzymes, le nombre des coenzymes ne dépasse guère une vingtaine. C'est dire que chaque coenzyme peut participer à la structure et au fonctionnement de nombreuses enzymes différentes (tableau 3.1, p. 88).

Tous les coenzymes présentent en commun un certain nombre de caractéristiques.

— *Ils ne sont pas de nature protéique.* Ce sont des composés organiques de masse molaire relativement faible, thermostables. La plupart possèdent *un ou plusieurs noyaux cycliques ou hétérocycliques* (noyau tétrapyrrolique, noyaux pyrimidique, thiazolique, purique, etc.) et présentent une *structure fortement conjuguée, riche en électrons π mobiles,* à l'origine de leur pouvoir catalytique.

Beaucoup de ces noyaux ne sont pas synthétisés par tous les organismes vivants. Ils correspondent alors pour ces derniers à des *facteurs de croissance* ou à des *vitamines,* en particulier du groupe *B*. Ces *coenzymes vitaminiques* expliquent le caractère indispensable de certaines vitamines pour la croissance et l'entretien des organismes ainsi que la plupart des troubles résultant d'une carence.

Tableau 3.1. Les principaux coenzymes (d'après Karlson)

Nom du coenzyme	Abréviation	Vitamine	Structure générale	Groupement transféré
Nicotinamide-adénine-dinucléotide	NAD^+	Nicotinamide (vitamine PP)	Dinucléotide pyridinique	H
Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate	$NADP^+$	Nicotinamide	Dinucléotide pyridinique phosphorylé	H
Flavine-mononucléotide	FMN	Riboflavine (vitamine B_2)	Riboflavine phosphorylée	H
Flavine-adénine-dinucléotide	FAD	Riboflavine	Adénosine-5'-monophosphate et riboflavine phosphorylée	H
Acide lipoïque ou lipoate	$Lip(S_2)$	Acide lipoïde	—	H et acétyl
Métalloporphyrines	—	—	Hème ou hématine	Electrons
Adénosine triphosphate	ATP	—	Ribonucléotide-phosphates	Phosphate et AMP
Uridine-diphosphate	UDP	—	Ribonucléotide-phosphates	Ose, acide uronique
Cytidine-diphosphate	CDP	—	Ribonucléotide phosphates	Phosphorylcholine
Coenzyme A	CoA	Acide pantothénique	—	Acyl et acétate
Acide tétrahydrofolique	THF	Acide folique	—	Groupement en C_1
Biotine	—	Biotine (vitamine H)	—	Groupement carboxylique
Thiamine-pyrophosphate ou diphosphotiamine	TPP ou DPT	Thiamine (vitamine B_1)	Ester diphosphorique de la thiamine	Groupement en C_2
Pyridoxal-phosphate	PALP	Pyridoxine (vitamine B_6)	Ester phosphorique du pyridoxal	Groupement aminé

— *Ils participent stoechiométriquement à la réaction enzymatique*. Les coenzymes réagissent chimiquement avec le substrat mais à la fin d'une transformation, qui peut faire intervenir une ou plusieurs enzymes, ils se retrouvent identiques à l'état

initial d'où leur activité catalytique. Enfin il faut rappeler que la spécificité enzymatique dépend uniquement de l'apoenzyme.

A. Les deux types de coenzymes

La majorité des réactions enzymatiques du métabolisme intermédiaire auxquelles prennent part des enzymes à structure double peuvent se ramener à des *réactions de transfert* (transferts d'électrons, d'hydrogène, de groupement acétyl, de radical phosphoré, etc.). Si à partir d'un substrat *A—R* il y a transfert du groupement *R* sur le substrat *B* en présence de l'enzyme *E* et du coenzyme Co, nous pouvons écrire l'équation de réaction :

$$A{-}R + B \underset{E-\mathrm{Co}}{\rightleftarrows} A + B{-}R\,.$$

Cette équation globale doit être décomposée en deux temps, le coenzyme servant d'accepteur intermédiaire du radical *R* comme l'ont confirmé les résultats expérimentaux. Soit :

1) Fixation :

$$A{-}R + \mathrm{Co} \overset{E}{\rightleftarrows} \mathrm{Co}{-}R + A\,.$$

2) Transfert :

$$\frac{\mathrm{Co}{-}R + B \overset{E}{\rightleftarrows} B{-}R + \mathrm{Co}}{AR + B \underset{E-\mathrm{Co}}{\rightleftarrows} B{-}R + A}\,.$$

1. COENZYMES GROUPEMENTS PROSTHÉTIQUES

Les deux temps de la réaction peuvent être catalysés par la même enzyme, le composé intermédiaire Co—*R* n'est pas libéré et son identification est souvent difficile. Le coenzyme n'a alors qu'un ***rôle activateur*** et il est généralement lié à la partie protéique de façon non dissociable, sa libération entraînant la dénaturation de la protéine. Ce coenzyme activateur est en fait un groupement prosthétique, il est une partie intégrante de la molécule d'enzyme.

2. COENZYMES TRANSPORTEURS OU COSUBSTRATS

Les deux temps de la réaction peuvent être catalysés par deux enzymes distinctes, ce qui nécessite que la combinaison *E*—Co soit facilement dissociable pour permettre le transport du groupement Co—*R*. Le coenzyme possède alors un ***rôle de transporteur*** entre deux et parfois plusieurs réactions distinctes. Dans ce cas,

plusieurs enzymes utilisent le même coenzyme, d'où leur nombre restreint. Malgré tout, la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du coenzyme est généralement très étroite, ce qui conduit à admettre un site spécifique pour celui-ci, voisin du site actif du substrat.

La coupure entre les deux types de coenzymes n'est pas toujours aussi nette. Certains transporteurs sont solidement liés à quelques enzymes et des groupements prosthétiques peuvent être dissociés assez facilement. Enfin dans certaines réactions enzymatiques complexes, où interviennent plusieurs enzymes distinctes, il est difficile de savoir quel est le comportement du coenzyme.

B. Les principaux coenzymes

Par suite de l'importance particulière des phénomènes d'oxydoréduction dans le métabolisme intermédiaire on distingue classiquement :

— *les coenzymes d'oxydoréduction,* catalysant les transferts d'hydrogène et d'électrons ;

— *les coenzymes de transfert de groupements,* participant aux réactions enzymatiques donnant lieu à un transfert de groupement carboné plus ou moins complexe, de groupement aminé ou phosphorylé, etc.

Dans ces deux catégories les coenzymes impliqués sont tantôt des groupements prosthétiques, tantôt des cosubstrats.

1. LES COENZYMES DES OXYDORÉDUCTASES

a. Les nicotinamides nucléotides ou nucléotides pyridiniques

• **Généralités :** Ces coenzymes possèdent la structure générale d'un dinucléotide mais l'un des nucléotides est du type pyridinique, la base hétérocyclique étant constituée par le dérivé pyridinium (ammonium quaternaire) de la nicotinamide.

La répartition cellulaire de ces coenzymes étant universelle, tous les organismes ont des besoins en nicotinamide ou en acide correspondant : l'acide nicotinique. Un grand nombre d'êtres vivants sont capables d'en réaliser la biosynthèse à partir du tryptophane, certains cependant (quelques micro-organismes et les animaux supérieurs) en sont incapables. Pour ces derniers l'amide nicotinique constitue un facteur vitaminique hydrosoluble du groupe B : la vitamine PP ou antipellagreuse. En fait le caractère vitaminique n'apparaît souvent qu'au second degré, un apport suffisant de tryptophane peut compenser une carence vitaminique.

Deux coenzymes appartiennent à ce groupe, ce sont :

— Le nicotinamide-adénine-dinucléotide ou NAD^+ (appelé autrefois *diphosphopyridine-nucléotide ou* DPN, *coenzyme* 1, *codéshydrogénase* 1, *cozymase*) contient de l'adénine et de la nicotinamide comme bases hétérocycliques, deux molécules de *D*-ribose et des résidus phosphates formant un pont pyrophosphate.

— Le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate ou $NADP^+$ (appelé autrefois triphosphopyridine nucléotide ou TPN, coenzyme II ou codéshydrogénase 2). Sa structure est identique à celle du NAD^+ avec en plus un résidu phosphate qui estérifie l'hydroxyle en 2' du ribose lié à l'adénine (fig. 3.40).

Pyridine Nicotinamide : vitamine PP

La structure du NADP⁺ se distingue de celle du NAD⁺ par la phosphorylation de cet —OH.

Figure 3.40 Structure de la vitamine PP et du NAD^+.

Dans les coenzymes les liaisons N—osidiques entre le ribose et les bases azotées sont de configuration β comme dans les nucléotides puriques. Des isomères α, inactifs enzymatiquement, ont été isolés de certaines préparations. Leur origine et leur rôle éventuel sont inconnus.

• **Mécanisme de l'oxydoréduction**

Ces coenzymes peuvent subir une oxydoréduction réversible dont l'étude à l'aide d'isotopes (deutérium par exemple) a permis de préciser le mécanisme (fig. 3.41).

$$AH_2 + NAD^+ \rightleftarrows NADH + H^+ + A$$

Figure 3.41 Mécanisme d'action du NAD^+.

— A partir d'un substrat réduit AH_2 il y a transfert direct de 2 électrons et d'un proton au coenzyme et libération d'un proton. C'est donc un ion hydrure H^- qui est transféré au coenzyme. L'ammonium quaternaire est transformé en azote trivalent et l'atome d'hydrogène se fixe en 4 (para) sur le noyau pyridinique.

H Ⓗ CONH$_2$ N R Forme *A*

Ⓗ = hydrogène transféré

Ⓗ H CONH$_2$ N R Forme *B*

Pour simplifier l'écriture les formes oxydées sont parfois symbolisées NAD ox ou NAD^+ et les formes réduites NAD red ou $NADH_2$ ou NADH, H^+. Il en est de même pour $NADP^+$.

— *La réduction est stéréospécifique.*

Selon les réactions enzymatiques, l'hydrogène est transféré en avant du plan du cycle (forme *A*-alcool déshydrogénase ou lacticodéshydrogénase) ou en arrière (forme *B*-glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase).

Cette stéréospécificité n'a pas reçu jusqu'alors d'explication.

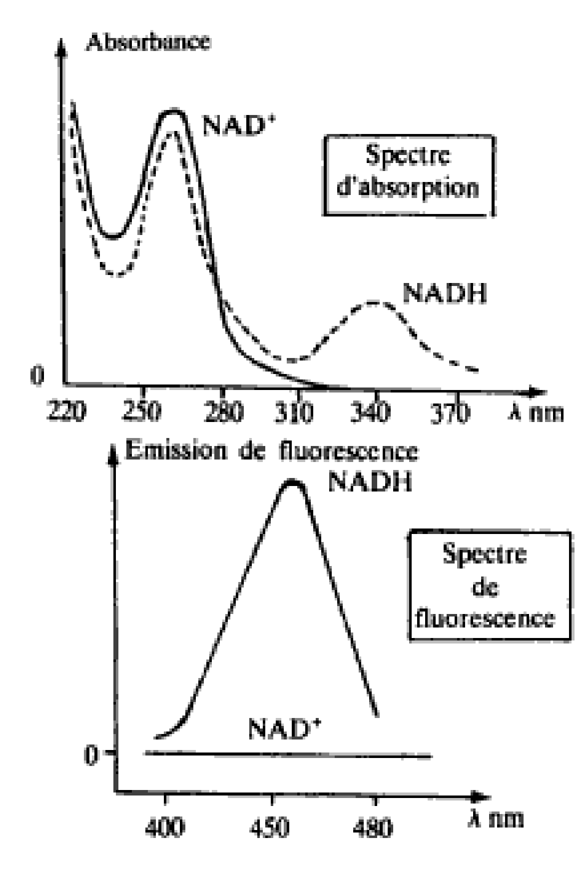


Figure 3.42 Spectres du NAD réduit et oxydé.

• **Propriétés**

— Ces coenzymes hydrosolubles possèdent un spectre d'absorption ultraviolet commun à tous les nucléotides ($\lambda = 260$ nm). Les formes réduites présentent une bande supplémentaire pour $\lambda = 340$ nm due à la pyridine réduite (fig. 3.42). Il y a simultanément légère diminution de l'absorbance à 260 nm.

— Les formes réduites sont fluorescentes, le spectre d'émission ayant un maximum pour $\lambda = 460$ nm. Il en est de même pour de nombreux produits

d'addition sur NAD^+ ou $NADP^+$ qui transforment l'azote quaternaire en azote trivalent (fig. 3.42).

— Les formes oxydées sont instables en milieu alcalin (rupture de la liaison N-osidique et libération de la nicotinamide) ; les formes réduites sont instables en milieu acide (saturation partielle du noyau pyridinium). Cette propriété est utilisée pour déterminer le rapport des formes réduite et oxydée des coenzymes dans un milieu.

• **Distribution et rôle**

— Ces coenzymes sont universellement répandus dans la matière vivante et à l'intérieur des structures cellulaires même si les échanges directs ne sont pas toujours possibles. Il semble qu'en général le NAD^+ (NAD^+ + NADH) domine par rapport au $NADP^+$ (NADP red et ox) et que la forme oxydée du NAD^+ soit prédominante alors que pour le $NADP^+$ c'est la forme réduite. Nous verrons l'importance de cette distribution lors de l'étude des métabolismes (tabl. 3.2).

Tableau 3.2. Distribution des coenzymes pyridiniques dans les cellules

Cellules	Coenzyme total 10^{-6} g/g tissu	NAD^+ %	NADH %	$NADP^+$ %	NADPH %
Foie	780	46	26	2	26
Cœur	516	57	35	1	7
Glande mammaire	360	63	22	0	15
E. coli	320	57,0		10,3	
Saccharomyces	525	72,2		10,3	
Proteus vulgaris	424	59,0		5,8	

— Ces deux composés sont des cosubstrats de nombreuses oxydoréductases. Ils se comportent cependant comme un groupement prosthétique, solidement fixé à l'apoenzyme, dans quelques cas exceptionnels : NAD^+ de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase par exemple.

• Le NAD^+ fonctionne le plus souvent à *l'état oxydé* NAD^+ dans les réactions du catabolisme, en liaison avec un grand nombre d'apoenzymes. Les principales transformations catalysées sont :

$$\begin{array}{ccccc} \text{alcool primaire} & \longrightarrow & \text{aldéhyde} & \longrightarrow & \text{acide} \\ R\text{—}CH_2OH & & R\text{—}CHO,\ H_2O & & R\text{—}COOH \\ \text{alcool secondaire} & \longrightarrow & \text{cétone} & \longleftarrow & \text{amine} \\ R\text{—}CHOH\text{—}R' & & R\text{—}CO\text{—}R' & & R\text{—}CHNH_2\text{—}R' \end{array}$$

Le NADH, H^+ est ultérieurement *réoxydé dans la chaîne respiratoire cytochromique* en aérobiose, ou par un processus fermentaire en anaérobiose.

• Le $NADP^+$ fonctionne le plus souvent sous *forme réduite* NADPH dans les *réactions anaboliques*, en liaison avec un nombre limité d'apoenzymes, en particulier au cours de la biosynthèse des acides gras. La forme réduite prend naissance lors de certaines étapes du catabolisme : voie de pentoses-phosphates ou oxydation de l'isocitrate cytoplasmique.

b. Les flavines nucléotides

• **Généralités :** Ces coenzymes dérivent de la riboflavine ou lactoflavine ou vitamine B_2 dont la molécule est composée d'un hétérocycle dérivé de l'alloxazine lié à un pentalcool acyclique, le ribitol.

Les principaux nucléotides flaviniques sont :

— Le flavine mononucléotide ou FMN (riboflavine-5'-phosphate).

— Le flavine adénine dinucléotide ou FAD dans lequel le FMN est uni à l'adénosine monophosphate ou AMP (fig. 3.43).

$CH_2-CHOH-CHOH-CHOH-CH_2OH$

Riboflavine

$CH_2-CHOH-CHOH-CHOH-CH_2-O-P(O)(O^-)-O-P(O)(O^-)-O-CH_2$

FMN

AMP

FAD

Figure 3.43 Structure de la riboflavine, du FMN et du FAD.

Ces composés ne sont pas de véritables nucléotides puisque la riboflavine n'est pas un nucléoside vrai car le ribitol n'est pas un pentose mais un polyol.

• **Mécanisme de l'oxydoréduction**

Ces coenzymes peuvent subir une oxydoréduction réversible par transfert d'hydrogène en position 1 et 10 selon la figure 3.44.

Ce mécanisme d'oxydoréduction met en jeu 2 électrons (et 2 protons). Un autre processus ne mettant en jeu qu'un seul électron et conduisant à la formation de radicaux libres (formes semi-quinoniques FAD .) fortement colorés est envisagé pour certaines enzymes flaviniques.

$$AH_2 + \begin{Bmatrix} FMN \\ ou \\ FAD \end{Bmatrix} \rightleftharpoons \begin{Bmatrix} FMNH_2 \\ ou \\ FADH_2 \end{Bmatrix} + A$$

Figure 3.44 Mécanisme d'action des coenzymes flaviniques.

Des cations participent souvent à la catalyse avec les coenzymes flaviniques (Fe, Mo).

• **Propriétés**

Ces coenzymes hydrosolubles, stables en milieu acide mais labiles en milieu alcalin, présentent d'intéressantes propriétés optiques.

— Ils absorbent la lumière dans le visible et dans l'UV. La position des bandes d'absorption dépend : du coenzyme, FAD ou FMN ; de l'état oxydé ou réduit (la réduction diminue l'absorption dans le visible et déplace la bande UV vers 250 nm) ; de la forme, libre ou combinée à des apoenzymes. Les bandes d'absorption situées dans le visible sont responsables de la coloration jaune-vert très intense des composés flaviniques.

— Ils présentent une fluorescence intense, sous forme libre essentiellement.

— Ils sont photosensibles, le radical ribityl pouvant être scindé, ce qui donne naissance à la lumiflavine. Là encore, la combinaison avec une apoenzyme modifie cette propriété en protégeant le coenzyme.

• **Distribution et rôle**

FMN et FAD sont les coenzymes de plus d'une cinquantaine d'oxydoréductases répandues chez tous les êtres vivants et qui interviennent dans les différents métabolismes.

Les flavoprotéines à FMN sont peu nombreuses ; celles à FAD sont au contraire plus abondantes. Du point de vue du mode d'action, on distingue les flavoprotéines auto-oxydables de celles qui ne le sont pas.

Les flavoprotéines auto-oxydables sont capables de transférer l'hydrogène qu'elles transportent directement sur l'oxygène, avec formation de peroxyde d'hydrogène*, exemple : L-aminoacide oxydase (fig. 3.45).

Ces flavoprotéines sont cytoplasmiques dans la cellule eucaryote comme dans la cellule procaryote.

Les flavoprotéines non auto-oxydables sont membranaires, mitochondriales dans la cellule eucaryote, dans la membrane cytoplasmique des cellules procaryotes. Ce sont des transporteurs d'électrons des chaînes respiratoires ; exemples :

* Le peroxyde d'hydrogène doit être détruit sitôt formé par les peroxydases et/ou catalases.

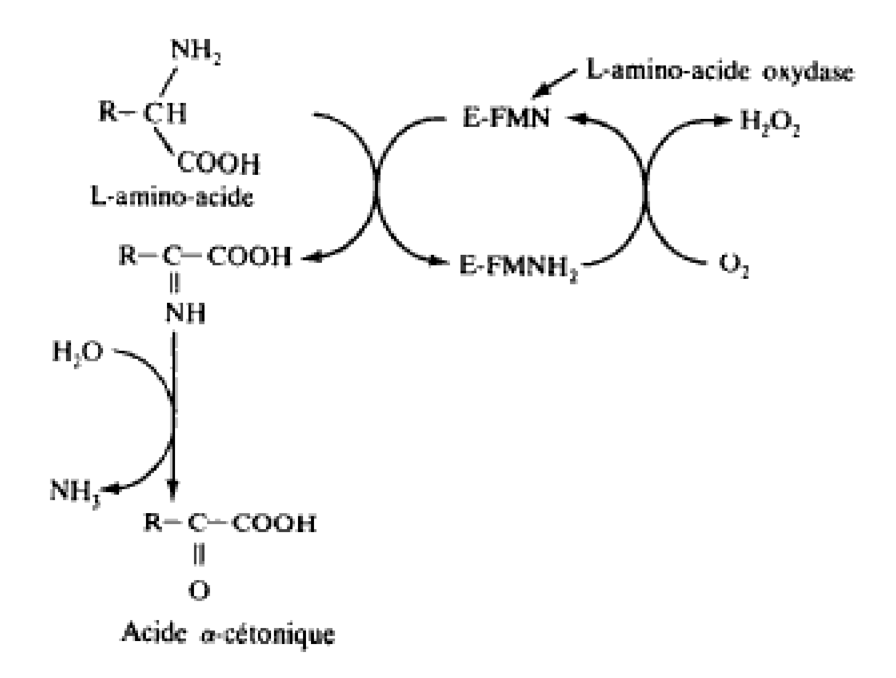


Figure 3.45 Mode d'action de la L-aminoacide oxydase.

FP_1 ou NADH déshydrogénase, FP_2 ou succinate-déshydrogénase, FP_3 ou acyl coenzyme A déshydrogénase, FP_4 ou glycérol phosphate déshydrogénase.

c. Les groupements prosthétiques des hémoenzymes ou métalloporphyrines

Ce sont de véritables groupements prosthétiques à rôle activateur que l'on rencontre dans les cytochromes et des oxydoréductases transportant des électrons (peroxydases).

Ces groupements prosthétiques sont des métalloporphyrines résultant de l'union, sous forme de complexe, d'un atome de fer avec une porphyrine qui représente elle-même un composé issu de substitutions plus ou moins complexes du noyau tétrapyrrolique ou porphine. L'exemple type de ce groupe est l'hème des hémoglobines ou ferroprotoporphyrine IX (fig. 3.46).

Dans les cytochromes, contrairement à ce qui a lieu dans l'hémoglobine, l'atome de fer peut changer réversiblement de valence, assurant ainsi le transfert d'électrons à raison d'un électron par molécule de coenzyme

$$Fe^{2+} \rightleftarrows Fe^{3+} + e^- .$$

Par ailleurs, la fraction protéique peut être liée au groupement tétrapyrrolique par des liaisons de covalence (*Ex.* : cytochrome c deux liaisons *—S—* à partir de 2 résidus cystéyl) et l'atome de fer est solidaire de l'apoenzyme par deux coordinances incluant généralement des résidus histidyl.

Dans les catalases et les peroxydases, le fer reste toujours à l'état ferrique Fe^{3+}, il n'y a pas de modification de la valence au cours de la réaction.

Les catalases catalysent la décomposition de l'eau oxygénée :

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \tfrac{1}{2} O_2 .$$

Pyrrole

Noyau porphine

Ferroprotoporphyrine IX
ou protohème

Figure 3.46 Structure du noyau porphine et de l'hème.

Elles renferment quatre groupements hématiques par molécule et très souvent du cuivre.

Les peroxydases oxydent certains substrats à partir d'un peroxyde dont H_2O_2. Le groupement prosthétique est constitué par l'hématine (peroxydase du raifort) ou la cytohématine (verdoperoxydase du pus).

Les oxygénases catalysent l'incorporation directe d'un atome (*mono-oxygénases*) ou d'une molécule (*dioxygénases*) d'oxygène dans un substrat carboné. Elles se différencient des *oxydases* qui catalysent une oxydoréduction aux dépens de l'oxygène avec formation d'eau ou d'eau oxygénée. En fait la distinction n'est pas toujours aisée.

Certaines sont des hémoprotéines.

Ex. : La tryptophane oxygénase qui catalyse le premier stade de la dégradation oxydative du tryptophane avec rupture d'une double liaison du noyau indole et formation de N-formylkinurénine.

NH₂ — CO–CH₂–CH — COOH — NH–CHO

— Les hydroxylases des microsomes hépatiques qui participent notamment à des réactions de détoxification.

D'autres sont des métalloprotéines : cuproprotéines et ferroprotéines (Fe non hématinique). ***Ex.*** : Tyrosinase et dopamine β hydroxylase qui participent à la

biosynthèse de la noradrénaline (fig. 3.47) dans la médullosurrénale en association avec des cosubstrats qui sont ensuite régénérés aux dépens du NADPH, H^+.

Tyrosine $\xrightarrow[\text{(ptéridine)}]{+O_2}$ Dopa $\xrightarrow{-CO_2}$ Dopamine $\xrightarrow[\text{(ascorbate)}]{+O_2}$ Noradrénaline

Figure 3.47 Biosynthèse de la noradrénaline.

Des réactions d'hydroxylation semblables interviennent dans la biosynthèse des hormones stéroïdes et des prostaglandines.

d. Le lipoate

C'est l'un des derniers coenzymes découverts. *L'acide lipoïque* (fig. 3.48) ou *acide thioctique* est un composé simple à huit atomes de carbone et deux atomes de soufre qui peuvent passer réversiblement de l'état disulfure à la forme thiol.

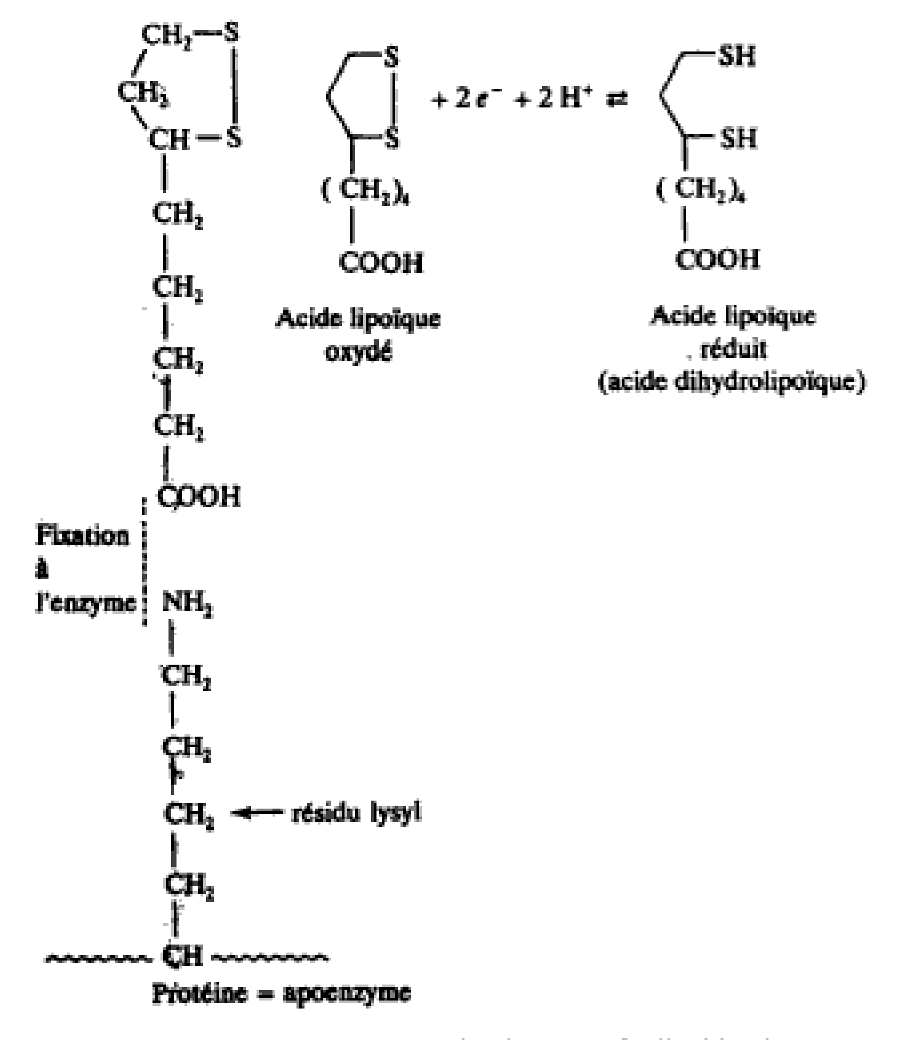


Figure 3.48 Structure et mode d'action de l'acide lipoïque.

C'est un composé liposoluble, coloré en jaune à l'état oxydé (légère absorption à λ = 335 mm qui disparaît à l'état réduit). Par son groupement carboxylique le lipoate est toujours lié à l'apoenzyme par une liaison covalente amidique avec le groupe ϵ animé d'un résidu lysyl. Cette liaison forte avec l'apoenzyme et l'absence de spectre d'absorption intense expliquent sa découverte tardive.

L'hydrogène fixé à partir du substrat peut être cédé à une déshydrogénase ayant pour coenzyme le FAD qui a la possibilité de le transférer ensuite au NAD^+ ; ce qui est exceptionnel pour une flavoprotéine.

Ce coenzyme participe à une réaction complexe mais très générale : la décarboxylation oxydative des acides α cétoniques (acide pyruvique, acide α cétoglutarique)(*cf.* p. 106 et p. 139), ainsi qu'au phénomène de la photosynthèse. Il ne représente pas véritablement une vitamine pour l'homme.

e. Les coenzymes quinoniques

Ces composés liposolubles sont dérivés de l'ubiquinone ou *coenzyme Q* présente dans les mitochondries animales.

Figure 3.49 L'ubiquinone. A. Structure. B. Mode d'action.

L'ubiquinone Q_{10} (fig. 3.49) isolée du cœur de bœuf comporte ainsi dix résidus isopréniques ($n = 10$).

Les chloroplastes renferment une *plastoquinone* de structure assez voisine.

Toutes les quinones présentent un spectre d'absorption caractéristique et peuvent être réduites réversiblement permettant ainsi les phénomènes d'oxydo-réduction.

D'autres dérivés à structure quinonique, vitamines *K* par exemple, ont été caractérisés dans les micro-organismes.

f. Autres coenzymes

Divers composés capables de subir une oxydoréduction réversible semblent jouer, au cours de certaines réactions, le rôle de coenzymes transporteurs ou cosubstrats vis-à-vis de l'hydrogène et des électrons.

Il en est ainsi en particulier chez les végétaux pour un tripeptide, le *glutathion* et pour l'*ascorbate*.

2. LES COENZYMES DE TRANSFERT DE GROUPEMENTS

Ces coenzymes qui catalysent le transfert des divers groupements, à l'exclusion de l'hydrogène et des électrons,.acceptent transitoirement la fraction de substrat pour former une *étape intermédiaire dite activée ou coenzymatique.*

a. L'adénosine triphosphate ou ATP

L'ATP dont la structure (fig. 3.50) et le rôle énergétique ont été décrits dans le paragraphe III du chapitre 2 de cet ouvrage, existe dans tous les tissus frais, où il joue un double rôle : de coenzyme transporteur de phosphate et de réserve d'énergie biologique.

Figure 3.50 Structure de l'ATP.

La réaction de transfert du phosphate s'écrit

$$X + ATP \xrightarrow[Mg^{2+}]{kinase} X{-}Ⓟ + ADP$$

Le complexe $[ATP\text{-}Mg]^{2-}$ est le cosubstrat des kinases

$$ATP^{4-} + Mg^{2+} \rightleftarrows [ATP\text{-}Mg]^{2-}\ .$$

Le groupement phosphate peut être transporté sur des groupements alcool, acide, amide :

Exemples :

$$\text{glucose} + ATP \xrightarrow{\text{hexokinase}} \text{glucose 6 phosphate} + ADP$$
$$\text{créatine} + ATP \xrightarrow{\text{créatine kinase}} \text{phosphocréatine} + ADP$$

L'ATP est également transporteur d'AMP, pyrophosphate ou adénosyl :

Exemple : activation des acides gras :

$$R{-}COOH + ATP \rightarrow R{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C} \sim AMP + PP$$

Les autres coenzymes nucléotidiques sont :

guanosine, mono, di et tri phosphate (GMP-GDP-GTP)
uridine, mono, di et tri phosphate (UMP-UDP-UTP)
cytidine, mono, di et tri phosphate (CMP-CDP-CTP)
thymidine, mono, di et tri phosphate (TMP-TDP-TTP)

Ces coenzymes sont susceptibles d'être les cosubstrats transporteurs de groupements divers qui sont ainsi activés.

Exemples :

— Le transfert du « sulfate » est réalisé par l'intermédiaire d'une forme activée ; le *sulfate actif ou adénosine 3-5' diphosphosulfate.*

— Les *formes actives des oses et des dérivés d'oses* (oses aminés, acides uroniques) font intervenir des diphosphonucléosides. ***Ex.*** : UDP-sucres (UDP glucose, UDP-galactose, UDP-xylose, UDP-glucuronate, UDP-N-acétyl glucosamine), GDP-mannose, ADP-glucose, etc.

— Il en est de même pour les *formes actives de la choline* (CDP-choline), de *l'éthanolamine* (CDP-éthanolamine), du *glycérol, du ribitol,* etc.

Enfin l'AMP intervient dans l'activation des aminoacides lors de la synthèse protéique.

b. Le pyridoxal phosphate ou PALP

L'importance de ce coenzyme est fondamentale car il participe sous forme de groupement prosthétique solidement lié à l'apoenzyme à de nombreux processus du *catabolisme des aminoacides.*

Sa structure chimique dérive directement de celle de la *vitamine* B_6 *ou pyridoxine ;* plus précisément du groupement vitaminique B_6 qui comprend, outre la pyridoxine, la pyridoxamine et le pyridoxal (fig. 3.51).

La phosphorylation de la fonction alcool primaire empêche la formation d'une liaison hémi-acétalique entre celle-ci et le groupement aldéhyde qui aurait pour effet de rendre le coenzyme inactif par blocage de la fonction aldéhyde.

Pyridoxine — Pyridoxamine — Pyridoxal — Pyridoxal phosphate

Figure 3.51 Structure de la vitamine B_6 et du pyridoxal phosphate.

Au cours de l'action catalytique le PALP se combine avec l'acide aminé pour former une imine aromatique ou *base de Schiff* (fig. 3.52).

Selon la nature de l'apoenzyme participant à la réaction, l'une des liaisons 1, 2 ou 3 sera préférentiellement fragilisée. Ce coenzyme est l'exemple type permettant la

CHO, HO, CH_2OⓅ, CH_3, N + R — CH (NH_2, COOH) → R—C—COOH (H; 1, 2, 3), N=CH, HO, CH_2OⓅ, H_3C, N + H_2O

Fig. 3.52 Mécanisme d'action du pyridoxal phosphate.

mise en évidence du rôle de l'apoenzyme dans la spécificité de la réaction enzymatique.

Les mécanismes électroniques des diverses réactions ont été expliqués, en particulier à partir de modèles dans lesquels l'apoenzyme est remplacé par un cation polyvalent, mais nous limiterons ici notre étude à l'énumération des transformations catalysées par ce coenzyme.

• Par coupure en 1 et départ d'un proton il y a formation d'une nouvelle amine de transition qui peut conduire :

— *à une transamination,* c'est-à-dire au transfert du groupement aminé d'un aminoacide 1 sur un acide α-cétonique 2 pour former l'aminoacide 2 et libérer l'acide α-cétonique 1.

Exemple :

$$\text{alanine} + \text{acide } \alpha\text{-cétoglutarique} \xrightleftharpoons{\text{ALAT*}} \text{acide glutamique} + \text{acide pyruvique}$$

— *à une **racémisation*** ou transformation d'un aminoacide en son stéréisomère.

Ex. : L-alanine ⇄ D-alanine

— *à des éliminations* ***en*** ***α-β*** ou ***γ*** par rapport au carboxyle de l'aminoacide.

Ex. :

Elimination en $\alpha\beta$

$$HS-\overset{\beta}{C}H_2-\overset{\alpha}{C}H(COOH)(NH_2) + H_2O \rightarrow H_2S + NH_3 + CH_3-CO-COOH$$

Cystéine — Acide pyruvique

Elimination en ν

$$Ⓟ-O-\overset{\gamma}{C}H_2-CH(COOH)(NH_2) + H_2O \rightarrow Pm + CH_3-CHOH-CH(COOH)(NH_2)$$

Phosphohomosérine — Thréonine

(*) ALAT = alanine aminotransférase.

Par coupure en 2 il y a élimination de CO_2 et formation d'une amine : c'est une décarboxylation :

$$HOCH_2-CH(NH_2)-COOH \rightarrow CO_2 + HOCH_2-CH_2-NH_2$$

Sérine → Ethanolamine

En bactériologie, deux réactions de décarboxylation d'acides aminés présentent un intérêt analytique :

$$NH_2-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow{LDC^*} NH_2-(CH_2)_5-NH_2 + CO_2$$

Lysine → Cadavérine

$$NH_2-(CH_2)-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow{ODC^*} NH_2-(CH_2)_4-NH_2 + CO_2$$

Ornithine → Putrésceine

• Par coupure en 3 il y a élimination de la chaîne latérale de l'acide aminé et formation de glycine, le radical éliminé se combinant transitoirement avec un autre coenzyme. Inversement cette réaction permet des condensations lors de la synthèse d'aminoacides.

Ex. : Transformation sérine ⇄ glycine

$$HOCH_2-CH(NH_2)-COOH \underset{Co}{\rightleftarrows} CH_2(NH_2)-COOH + Co-CH_2OH$$

Sérine → Glycine

Condensation de l'éthanal et de la glycine pour donner la thréonine.

Condensation de la sérine et de l'indole pour former le tryptophane.

Il faut signaler que ce coenzyme présente de nombreux antagonistes dont le rôle est essentiel par suite de l'importance métabolique du PALP. En particulier l'isoniazide, particulièrement actif *in vivo* et *in vitro*, est un antituberculeux utilisé en traitement clinique (Rimifon®).

$$C_5H_4N-CO-NH-NH_2$$

* LDC = lysine décarboxylase. ODC = ornithine décarboxylase.

c. Le coenzyme A ou HSCoA

Ce coenzyme universellement répandu résulte de l'association :

— d'un nucléoside phosphorylé, l'adénosine-3'-phosphate-5'-diphosphate.

— d'une molécule d'acide pantothénique (vitamine du groupe B) qui est le produit de condensation de la β-alanine et de l'acide pantoïque par une liaison amide ;

— d'une molécule de thioéthanolamine ou β-mercaptoéthylamine ou encore cystéamine puisqu'elle dérive de la décarboxylation de la cystéine (fig. 3.53).

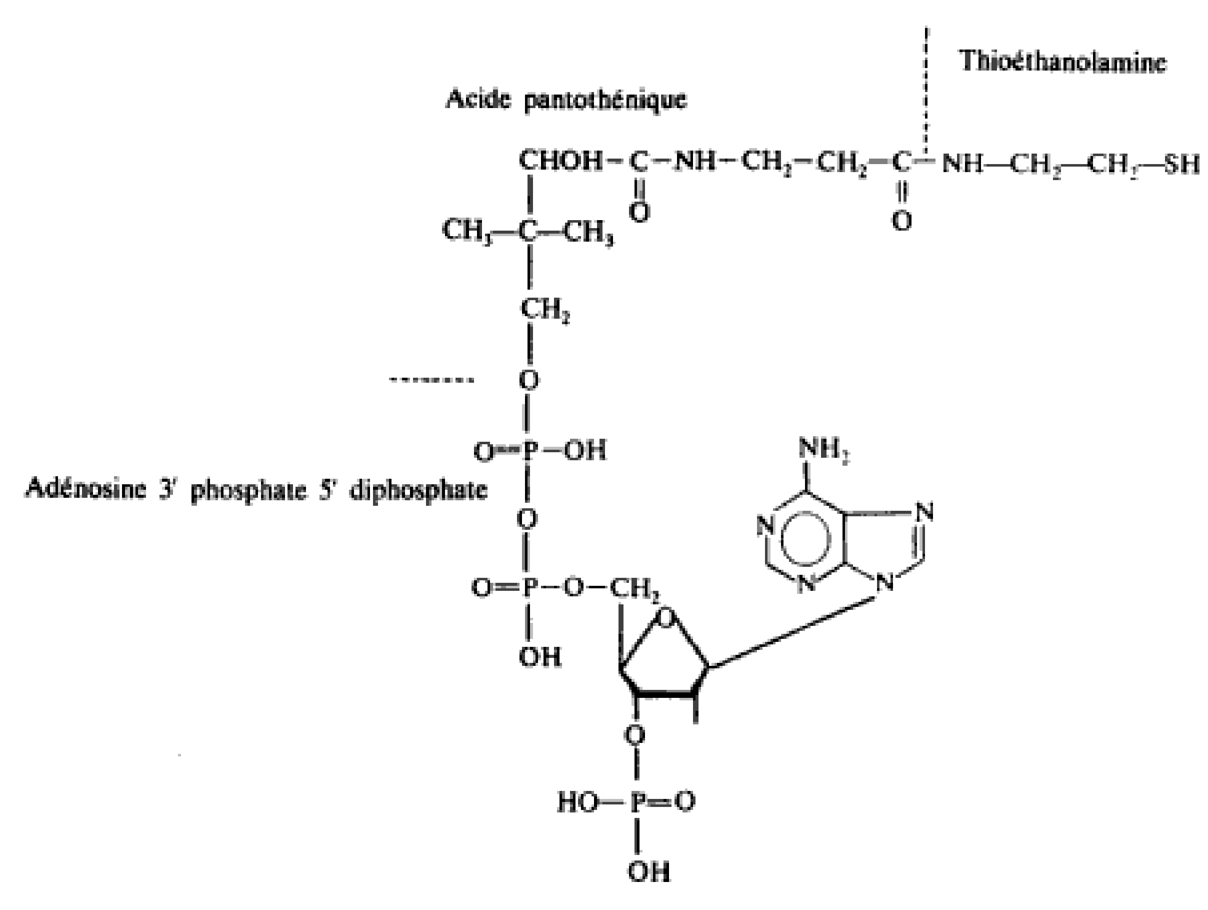


Figure 3.53 Structure du coenzyme A(CoA-SH).

Le site essentiel de ce coenzyme est la fonction thiol d'où son symbole CoA-SH ou HS-CoA.

Le groupement thiol peut se condenser avec le groupement carboxyle d'un acide gras pour former une liaison énergétique du type acylthioester (ou acylmercaptan) :

$$\text{R-CO} \sim \text{SCoA} + H_2O \rightarrow \text{R-COOH} + \text{HS-CoA} \; ; \quad \Delta G_0' = -25 \text{ kJ/mol} .$$

Le produit de condensation est un acylcoenzyme A ; celui correspondant à l'acide acétique ($R = CH_3$) est l'acétyl-coenzyme A ou acétyl-CoA. Ces groupements sont ainsi sous une forme activée.

Le coenzyme A est un cosubstrat transporteur de groupements acyl et acétyl qui intervient dans de nombreuses voies du métabolisme.

d. Le pyrophosphate de thiamine (TPP) ou diphosphothiamine (DPT)

Ce coenzyme dérive de la vitamine B_1 ou thiamine (fig. 3.54) ou aneurine dont la carence est à l'origine des troubles caractéristiques du béri-béri.

Chaînon monocarbone

Noyau pyrimidine — Noyau thiazolium

Thiamine ou vitamine B_1

Thiamine pyrophosphate ou TPP^+

Figure 3.54 Structure de la vitamine B_1 et de la thiamine pyrophosphate.

La TPP est toujours solidement fixée à l'enzyme. C'est un activateur du groupement aldéhydique à partir d'un donneur qui est un composé cétonique. Le groupement aldéhydique se lie au carbone n° 2 du cycle thiazolium pour former « un aldéhyde actif ».

$$R{-}CO{-}COOH \xrightarrow{TPP} R{-}CHOH{-}C \; (+\ CO_2)$$

Ce coenzyme participe en particulier à la réaction de décarboxylation oxydative des acides α cétoniques (acides pyruvique et α-cétoglutarique) ainsi qu'au cycle des pentoses-phosphates.

L'équation bilan de la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique (fig. 3.55) s'écrit :

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + HS-CoA \xrightarrow[\text{acide lipoïque}]{NAD^+ \quad TPP \quad NADH, H^+} CO_2 + CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C} \sim SCoA$$

Acide pyruvique — Pyruvate déshydrogénase — Acétyl CoA

$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH$; TPP ; CO_2 ; TPP-Ethanal

$S\sim\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3$; SH ; $(CH_2)_4$; COOH

CoA-SH ; $CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-CoA$

S ; S ; $(CH_2)_4$; COOH

SH ; SH ; $(CH_2)_4$; COOH

NADH, H^+ ; NAD^+

Figure 3.55 Mécanisme simplifié (*) et schématisé de la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique.

e. Autres coenzymes de transfert de groupements

• ***Les uns participent au métabolisme des chaînons monocarbonés***

La biotine ou vitamine H est un coenzyme de transfert de CO_2 inactivé par une protéine du blanc d'œuf : l'avidine.

La biotine se lie solidement à l'apoenzyme par une liaison peptidique (entre son —COOH et un $-NH_2$ en ε d'une lysine). Elle existe également à l'état libre et combinée à la lysine (N-biotinyl-lysine ou biocytine) (fig. 3.56).

En présence d'ATP la biotine forme une adénosine pyrophosphate-biotine qui réagit avec CO_2 pour donner la N-carboxybiotine qui représente la forme activée du dioxyde de carbone.

Exemple : Synthèse du malonyl CoA à partir de l'acétyl CoA

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-CoA + CO_2 \xrightarrow[ATP + H_2O \;\rightarrow\; ADP + P_i]{} COOH-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SCoA$$

Acétyl CoA — Malonyl CoA

L'acide folique et ses dérivés : acide tétrahydrofolique (FH_4) qui est la forme active, dérivés polyglutamiques de l'acide folique. Liés à des apoenzymes spécifiques ils constituent les ptéroprotéines qui sont des enzymes catalysant les transferts des

(*) En réalité, cinq coenzymes interviennent puisque l'on a mis en évidence la fonction d'un FAD sous forme semi-quinonique (p. 155).

Figure 3.56 La biotine. A. Structure. B. Mode d'action.

groupements formyle —CH=O, formimino —CH=NH, hydroxyméthyle $—CH_2OH$.

La vitamine B_{12} ou vitamine antianémique est le coenzyme participant :

— à des réactions d'isomérisation par migration intramoléculaire d'un groupement monocarboné ou d'un résidu glycine ;

— à des transports de groupement méthyle ;

— à des réductions des radicaux formyle ou hydroxyméthyle en radical méthyle.

L'adénosyl-méthionine est le principal donneur de groupements méthyles sous la forme CH_3^+.

VIII. PRÉPARATION DES ENZYMES

Elle n'est pas fondamentalement différente de celle des protéines ; il faut toutefois dans ce cas éviter au maximum la dénaturation, car la diminution de l'activité enzymatique apparaît de façon précoce.

Les principaux temps de l'opération diffèrent selon l'enzyme, il n'y a pas de méthode absolument générale, toutefois on retrouve toujours :

— une extraction. La plupart des enzymes étant endocellulaires (endoenzymes), l'extraction doit être précédée d'une préparation du matériel biologique : broyage, congélations et décongélations successives, ultra-sons, etc. Les solvants d'extraction les plus courants sont : l'eau, les solutions salines diluées et tamponnées,

le glycérol... On procède selon les cas par épuisement systématique ou par macération.

On obtient un extrait brut, qui doit être purifié :

— une purification, c'est-à-dire une élimination de substances inactives par dialyse, électrodialyse, gel filtration, etc.

— une séparation des protéines. On distingue :

- les méthodes basées sur la **solubilité** des protéines : précipitations fractionnées (méthode de Cohn) ;
- les méthodes basées sur la **masse moléculaire** des protéines : ultracentrifugation, tamisage moléculaire ;
- les méthodes basées sur la **charge** des protéines : électrophorèse, isoélectrofocalisation, chromatographie sur échangeurs d'ions ;
- les méthodes basées sur les **propriétés biologiques** des enzymes : chromatographie d'affinité.

Les isoenzymes sont mis en évidence par électrophorèse.

L'exemple classique, mais il en existe beaucoup d'autres, est celui de la *lactate déshydrogénase* ou *lacticodéshydrogénase* (LDH). Cette enzyme tétramérique résulte de l'association de deux types de monomères, symbolisés H et M. Les cinq isoenzymes correspondants aux possibilités d'association : M_4, M_3H_1, M_2H_2, M_1H_3, H_4 peuvent être présents dans un même organisme, l'homme par exemple, avec une répartition variable selon les tissus (cœur, foie, muscle strié) mais aussi au cours de certains états pathologiques.

— une précipitation de l'enzyme, un contrôle de la préparation par détermination de son activité spécifique et les tests analytiques de pureté terminent cette préparation.

Une bonne conservation est obtenue après lyophilisation de la solution enzymatique.

Le contrôle et l'efficacité de ces opérations est fait en vérifiant l'intégrité des fonctions enzymatiques et en déterminant pour chacune d'elles :

— le taux d'enrichissement,

— le taux de récupération (ou rendement).

Pour déterminer le **taux d'enrichissement** on mesure l'activité spécifique AS (en UI/mg) de l'extrait avant purification et AS' après.

Le taux d'enrichissement est $\mathcal{T} = \frac{AS'}{AS}$; on dit alors que l'extrait a été enrichi $\mathcal{T}$ fois.

Pour déterminer le **rendement,** on mesure l'activité totale AT (en UI) de l'extrait avant purification et AT' après. Le rendement est $\rho = \frac{AT'}{AT}$.

La préparation d'enzymes est effectuée :

— pour obtenir des enzymes pures afin d'étudier leurs propriétés ainsi que le mécanisme de la réaction enzymatique, en utilisant des techniques fines de recherche ;

— pour obtenir des enzymes pures utilisées comme réactifs dans les dosages enzymatiques et les dosages ELISA ;

— pour obtenir des enzymes utilisées industriellement pour réaliser des transformations en biotechnologie.

IX. L'ANALYSE ENZYMATIQUE

L'analyse enzymatique est de pratique courante au laboratoire de biochimie ou d'analyses biologiques ; ce terme couvre la mesure de l'activité des enzymes et les dosages de substrats par voie enzymatique (*).

A. Mesure de l'activité des enzymes

— La *détermination d'une activité enzymatique* qui est une expression de la concentration en enzyme est devenue une analyse courante.

Ex. : Dosages des phosphatases et des transaminases sériques, etc.

Les méthodes de mesure de l'activité enzymatique sont nombreuses. Les unes sont essentiellement des techniques de recherche permettant une étude fine de la réaction enzymatique (polarisation rotatoire, méthodes d'analyse rapide).

Les autres sont utilisées pour la détermination des activités dans les produits biologiques, en particulier en pratique médicale. On peut distinguer :

• *Les méthodes d'analyse chimique directe* qui consistent à doser le substrat disparu ou le produit formé pendant un temps déterminé, dans les conditions expérimentales de détermination de V_M. Les techniques de dosage sont souvent colorimétriques, elles peuvent être aussi volumétriques, potentiométriques ou spectrophotométriques.

• *Les méthodes cinétiques spectrophotométriques ou fluorimétriques.* Dans ces techniques on visualise la cinétique enzymatique ce qui donne une garantie du bon déroulement de la réaction lorsque l'on obtient une droite.

D'autre part, ici, le point initial et le point final de la réaction importent peu. Un tronçon de la droite permet immédiatement le calcul de ΔP/min c'est-à-dire l'appréciation de l'activité enzymatique (fig. 3.57).

Dans cette méthode cinétique, il faut pouvoir observer la réaction sans la gêner ni la bloquer, et le produit ou le substrat ne se prêtent que très rarement à l'observation directe.

Il faut donc utiliser un indicateur permettant de suivre la réaction. Une excellente solution a été trouvée dans le suivi de l'absorbance à 340 nm de la transformation :

$$NAD^+ + 2\,H \rightleftharpoons NADH + H^+$$

(*) Nous conseillons au lecteur de consulter l'ouvrage suivant : Principe des méthodes d'analyse bochimique : de C. Audigié, G. Dupont et F. Zonszain, Doin Editeur, Tome I, p. 180 à 190.

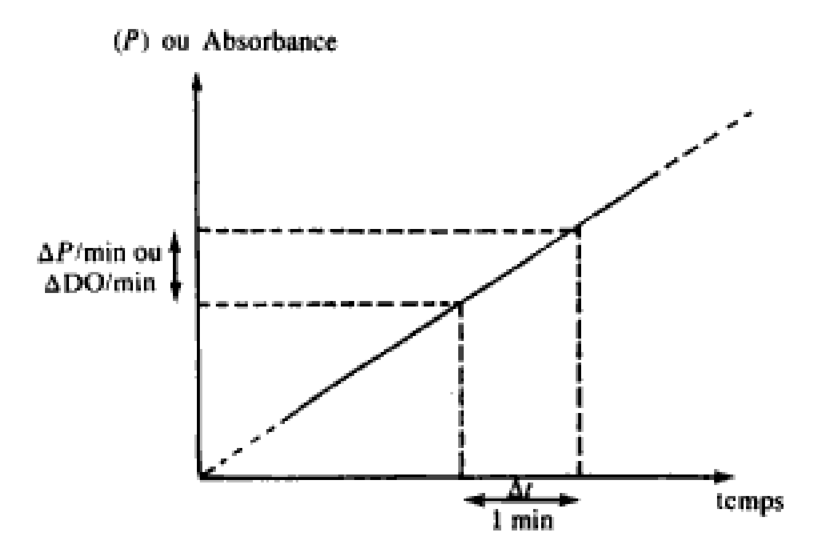


Figure 3.57 Courbe $P = f(t)$, dans les conditions initiales, en présence d'un excès de substrat.

car en effet seul NADH absorbe à cette longueur d'onde. Cette réaction indicatrice, ou test optique peut être utilisée pour toutes les réactions utilisant des enzymes à coenzyme NAD^+ :

$$S + NADH + H^+ \overset{E}{\rightleftharpoons} SH_2 + NAD^+$$

ou pouvant être combinée à une telle réaction

$$S \overset{E}{\rightarrow} P + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{E indicatrice}} PH_2 + NAD^+$$

Le couplage d'une réaction indicatrice complique les conditions du dosage, car dans ce cas deux enzymes agissent successivement, mais il permet la détermination de nombreuses activités enzymatiques.

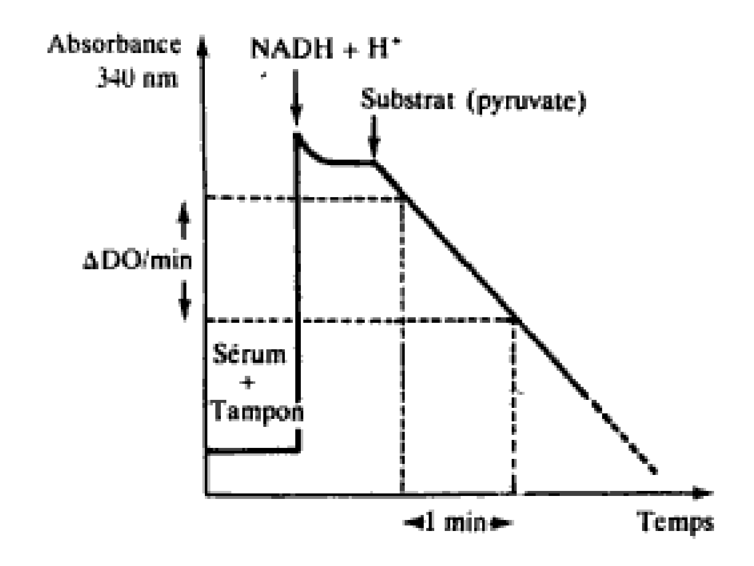


Figure 3.58 Utilisation du test optique pour le dosage de la lacticodéshydrogénase sérique.

Ces méthodes cinétiques présentent des avantages multiples : spécificité, précision, rapidité, fiabilité, facilité dans l'expression du résultat directement en unités internationales. Enfin elles s'appliquent aujourd'hui déjà à de très nombreuses enzymes et peuvent être facilement automatisées (fig. 3.58).

On peut utiliser d'autres réactions indicatrices pour certaines enzymes particulières ou une technique fluorimétrique pour le dosage du coenzyme.

B. Dosages enzymatiques

• *Le test optique* peut également être utilisé pour le dosage de substrats par voie enzymatique. La transformation d'un substrat S peut s'accompagner de l'apparition (ou de la disparition) de NADH + H^+.

$$SH_2 + NAD^+ \overset{E}{\rightleftarrows} NADH + H^+ + P$$

Lorsque la réaction est totale, la variation d'absorbance enregistrée à 340 nm est proportionnelle à la concentration initiale en substrat (fig. 3.59).

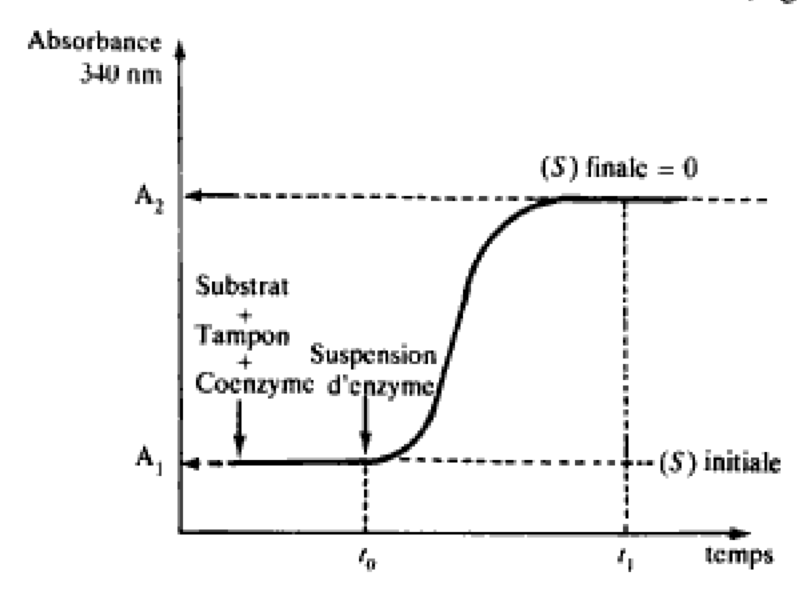


Figure 3.59 Enregistrement optique de la réaction indicatrice lors du dosage d'un substrat.

Les conditions de manipulation sont assez différentes des méthodes d'analyse cinétique. On réalise ici une consommation totale du substrat présent. L'allure de la courbe n'a d'ailleurs aucun intérêt si ce n'est d'indiquer la fin de la réaction. La manipulation consiste à déterminer :

— L'absorbance initiale A_1 à 340 nm qui mesure la concentration initiale de NADH, H^+, en présence du substrat à doser de concentration (S) ;

— L'absorbance finale A_2 à 340 nm qui mesure la concentration finale de NADH, H^+, après disparition totale du substrat, (S) = 0.

d'où $$\Delta A^{340} = K \times (S)$$

La valeur de K est fournie par un étalonnage, ou par application de la loi de Beer-Lambert.

Cette méthode est applicable immédiatement au dosage de certains substrats, comme le pyruvate, le lactate ou l'alcool et à d'autres substrats, triglycérides, glycérol, glucose par combinaison avec une réaction indicatrice.

Une nouvelle technologie de dosages enzymatiques, faisant appel aux électrodes à enzymes est récemment apparue*.

Sa mise en œuvre consiste à utiliser une électrode indicatrice, par exemple à l'O_2 dissous (électrode de Clark), ou au pH, ou au CO_2 etc., recouverte d'une membrane contenant une enzyme immobilisée.

Exemple : Dosage du glucose par la glucose oxydase. L'électrode à glucose est constituée d'une électrode à O_2 dissous (électrode de Clark) recouverte d'une membrane contenant de la glucose oxydase immobilisée (fig. 3.60).

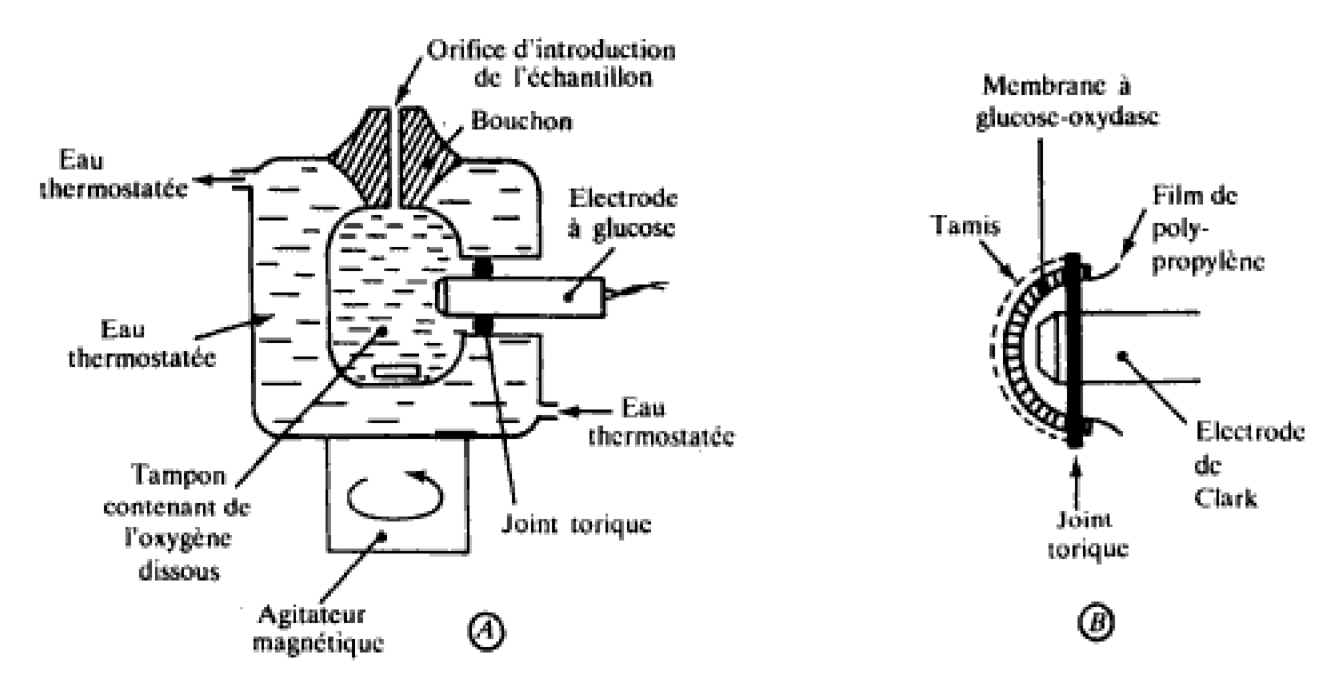


Figure 3.60 Electrode à glucose.
A. Montage. B. Détail de l'extrémité de l'électrode à enzyme.

Le milieu réactionnel est constitué d'un tampon, saturé en oxygène dissous. En introduisant l'échantillon à analyser, contenant le glucose à doser, on déclenche la réaction :

$$\text{glucose} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{acide gluconique} + H_2O_2 .$$

La consommation d'oxygène, mesurée à l'aide de l'électrode de Clark, est proportionnelle à la quantité de glucose présent dans l'échantillon. Il suffit d'étalonner la consommation d'O_2 en glucose pour disposer d'une méthode simple, spécifique et rapide de dosage.

* Nous renvoyons le lecteur vers l'ouvrage de D. Loncle, Génie Enzymatique, Doin Éditeur 1992.

X. L'UTILISATION INDUSTRIELLE DES ENZYMES, LE GÉNIE ENZYMATIQUE

Les enzymes sont utilisées dans des entreprises artisanales, industrielles ou agricoles, le génie enzymatique est l'une des branches de la biotechnologie.

La spécificité de leur action, leur fonctionnement dans des conditions de température relativement économique en font des catalyseurs très compétitifs face à ceux des procédés chimiques industriels classiques.

Certaines sont utilisées sous une forme soluble et jetées en fin de réaction, d'autres sont immobilisées sur des supports insolubles et inertes permettant une réutilisation répétée et la mise au point de réacteurs en continu.

A. Les différents procédés d'immobilisation des enzymes

La fixation des enzymes sur un support rappelle leur fonctionnement *in vivo* ; dans son milieu biologique l'enzyme agit le plus souvent fixée sur une membrane, un organite.

En recherche, on a pu créer des modèles théoriques destinés à comprendre et interpréter le mécanisme d'action des complexes naturels.

Cependant, la fixation des enzymes est un moyen utilisé en biotechnologie pour diminuer le coût des opérations de bio-conversion en permettant une utilisation répétée ou continue des enzymes.

Les trois types de procédés de fixation sont :

— l'inclusion dans un gel,
— l'adsorption sur un solide,
— la fixation par liaisons covalentes (fig. 3.61).

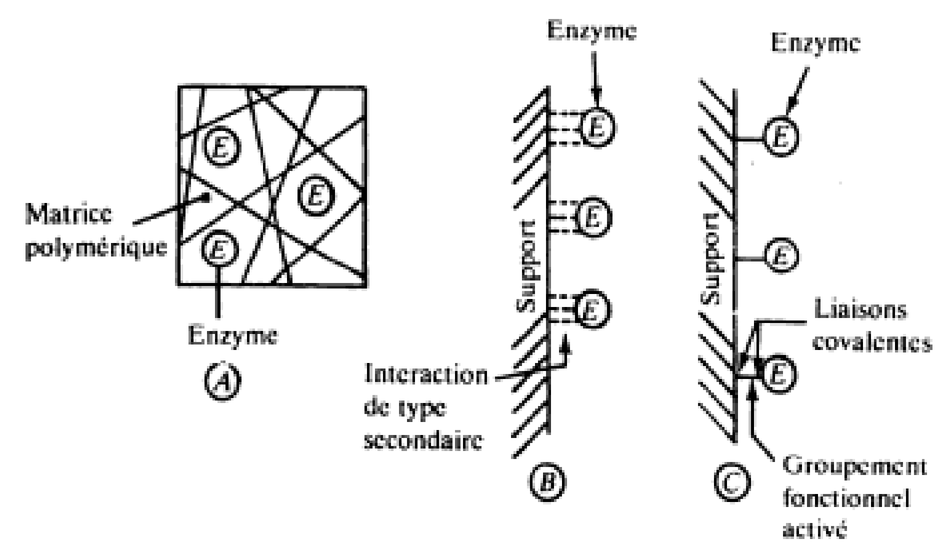


Figure 3.61 Immobilisation des enzymes.
A. Inclusion dans un gel. B. Adsorption sur un solide. C. Fixation par liaisons covalentes.

L'immobilisation par inclusion revient à emprisonner l'enzyme dans les mailles du réseau d'une matrice polymérique : gel de polyacrylamide, d'amidon, de carraghénanes, d'alginates, d'acétate de cellulose, etc. L'enzyme fixée se présente sous forme de billes, de capsules, de membranes.

C'est un procédé simple et universel, valable pour toutes les enzymes, mais les risques de fuite sont non négligeables si les mailles du réseau sont larges ; la cinétique enzymatique est compliquée par des phénomènes de diffusion de substrats et de produits si la réticulation est très serrée.

L'immobilisation par adsorption sur un support consiste à lier l'enzyme à la surface d'un solide par des liaisons secondaires (Van der Waals, hydrogène, ionique, hydrophobe, etc.) qui s'établissent entre des groupements d'atomes de l'enzyme et des groupements du support.

Les supports peuvent être minéraux (verre, silice, argile, etc.) ou organiques (cellulose, amidon, collagène, DEAE cellulose, etc.).

La fixation est un processus simple et réversible, mais les risques de désorption de l'enzyme sont importants, et la fixation ne peut être considérée comme spécifique.

L'immobilisation par liaisons covalentes peut être faite sur un support ou par coréticulation avec d'autres protéines. Il existe une grande variété de supports sur lesquels on ne peut greffer des groupements fonctionnels activés, organiques et minéraux.

La coréticulation consiste à diluer l'enzyme avec une protéine inactive puis à réticuler l'ensemble à l'aide de glutaraldéhyde.

L'avantage de ce procédé réside essentiellement dans la solidité de la liaison enzyme-support, mais la nécessité d'activer certains supports, puis de procéder à des réactions chimiques délicates de fixation représente un inconvénient certain. L'enzyme ainsi fixée acquiert des propriétés exceptionnelles de résistance aux variations de température, et de pH.

B. Utilisation industrielle actuelle des enzymes

Les secteurs d'activité du génie enzymatique sont variés :

- **l'agro-alimentaire :**

— production d'acides aminés
— production de glucose
— production de fructose en utilisant la glucose isomérase
— amélioration des propriétés de boissons alimentaires : viscosité, clarification, digestibilité, goût, etc.
— amélioration de procédés de panification
— amélioration de la production de produits lactés ;

- **la chimie industrielle et pharmaceutique :**

— production d'acides divers
— modification de la structure d'antibiotiques
— chimie des stéroïdes
— etc.

• **autres secteurs :**
— textile
— blanchissage
— tannerie
— etc.

4

La chaîne respiratoire : transfert d'électrons et phosphorylation oxydative

Le processus le plus énergétique de la respiration cellulaire est accompli par une série de transporteurs d'électrons formant une chaîne d'oxydation ; des électrons sont transférés sur un accepteur final : l'oxygène (il existe d'autres accepteurs chez les bactéries : le nitrate, le dioxyde de carbone, le sulfate).

La différence de potentiel d'oxydoréduction rend possible le transfert des électrons ; lorsque la différence de potentiel entre deux transporteurs est importante, une phosphorylation oxydative permet la synthèse d'un ATP.

Les systèmes transporteurs d'électrons des chaînes respiratoires, sont localisés dans des membranes : la membrane interne de la mitochondrie pour les cellules eucaryotes, la membrane cytoplasmique des bactéries qui possèdent une chaîne respiratoire.

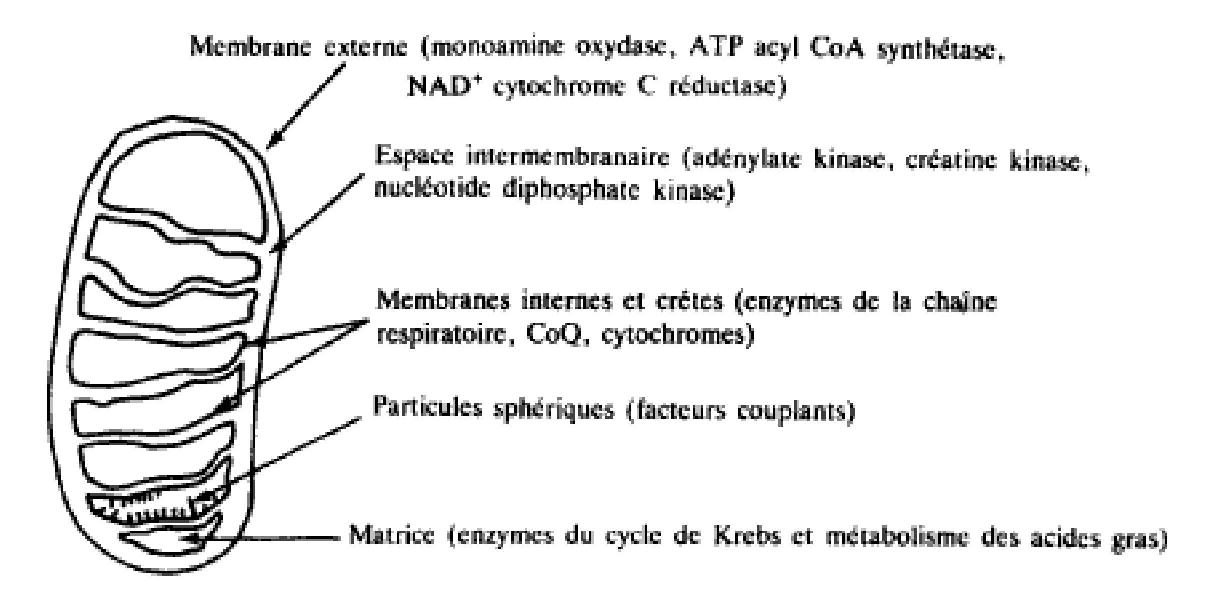


Figure 4.1 Structure schématique de la mitochondrie et localisation d'enzymes.

La localisation cytologique de la chaîne respiratoire dans la cellule eucaryote a été démontrée expérimentalement. On isole des mitochondries d'hépatocytes de rat, après broyage et centrifugation. Ces mitochondries mises en présence d'un substrat approprié, de phosphate, en milieu tamponné sont placées dans un appareil de Warburg ou un oxygraphe ; elles **respirent :** elles absorbent de l'oxygène et

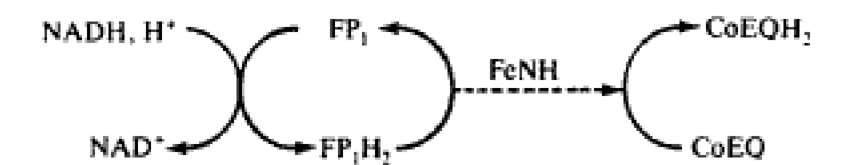
incorporent du phosphate minéral. En fractionnant les mitochondries, on constate que les membranes internes contiennent les transporteurs de la chaîne.

A. Les constituants de la chaîne respiratoire

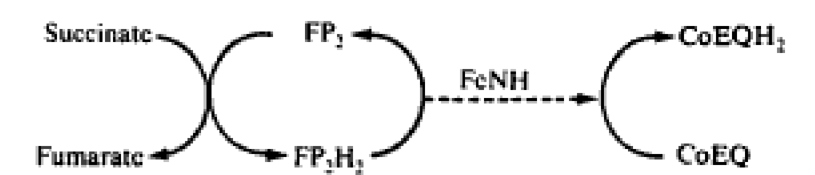
Une chaîne respiratoire représente un complexe multi-enzymatique dont les éléments sont disposés dans la membrane et regroupés en unités, chacune d'elles comprend des flavoprotéines, des cytochromes, des coenzymes quinoniques, des protéines à fer non héminique, du NAD^+.

1. LES FLAVOPROTÉINES

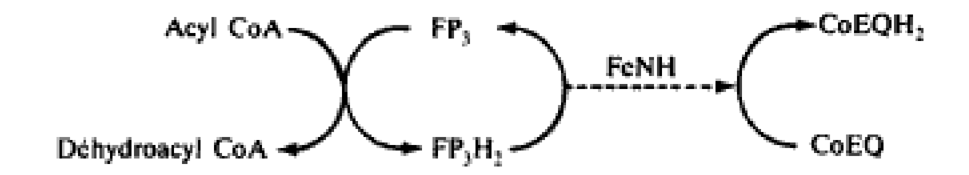
• **La NADH-déshydrogénase** (FP_1) catalyse la réoxydation du NADH ; c'est une FMN-flavoprotéine de masse moléculaire égale à 250.000 daltons.



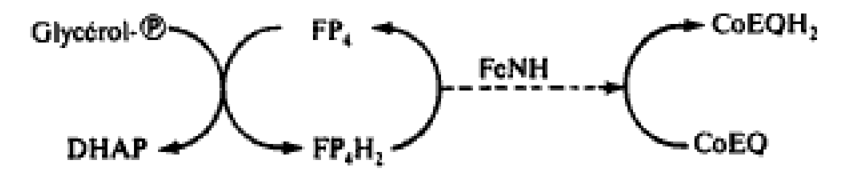
• **La succinate déshydrogénase** (FP_2) catalyse l'oxydation du succinate en fumarate ; c'est une FAD-flavoprotéine de masse moléculaire égale à 250.000 daltons.



• **L'acyl CoA déshydrogénase** (FP_3) catalyse l'oxydation des acyls CoA (catabolisme des acides gras) en déhydroacyls CoA, c'est une FAD-flavoprotéine.



• **La glycérol-phosphate déshydrogénase** (FP_4) catalyse l'oxydation du glycérol phosphate en dihydroxyacétone phosphate. C'est une FAD-flavoprotéine.



D'autres flavoprotéines ont été caractérisées, citons celles qui sont spécifiques de la choline et de la proline.

2. LES PROTÉINES A FER NON HÉMINIQUE (FeNH)

Ces protéines, également appelées protéines fer-soufre (FeS), sont associées aux flavoprotéines.

On ignore la nature exacte de l'organisation du complexe formé, aussi peut-on considérer les protéines fer-soufre comme des sous-unités constitutives des flavoprotéines.

Toutes les protéines FeS n'ont pas la même structure, pour certaines d'entre elles, le fer est complexé par des atomes de soufre provenant des chaînes latérales de cystéine, pour d'autres, le complexe formé renferme, en plus, du soufre sous forme minérale. Les protéines FeS sont des intermédiaires d'oxydoréduction entre les coenzymes des flavoprotéines et le coenzyme *Q* ou ubiquinone ; au cours des réactions de transport d'électrons, les atomes de fer passent réversiblement de l'état ferrique à l'état ferreux.

3. LES COENZYMES QUINONIQUES

Le coenzyme *Q* ou ubiquinone (fig 4.2) est le transporteur liposoluble de la chaîne respiratoire mitochondriale, c'est le seul qui ne soit pas groupement prosthétique d'une protéine. A côté de l'ubiquinone, qui est une benzoquinone, il existe dans certaines chaînes respiratoires bactériennes des coenzymes naphtoquinoniques.

Le coenzyme *Q* établit une jonction entre les flavoprotéines et le système des cytochromes, sa situation de collecteur d'électrons est primordiale.

CH_3-O, CH_3, CH_3-O, O, O, $(CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2)_n-H$ $\quad + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow \quad$ CH_3-O, OH, CH_3, CH_3-O, OH, $(CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2)_n-H$

CoEQ : forme oxydée quinonique

$CoEQH_2$: forme réduite para-diphénolique

Figure 4.2 Le coenzyme *Q* ou ubiquinone.

Le nombre des unités isopréniques varie selon les espèces, il est de 10 chez les mammifères, de 6 à 8 pour d'autres organismes.

4. LES CYTOCHROMES

Les cytochromes ou pigments cellulaires sont des hémoprotéines présentant des spectres d'absorption comportant le plus souvent trois bandes : deux dans le visible (α et β) une à la limite du visible et de l'ultraviolet (γ ou bande de Kiélin) (fig. 4.3).

Leur molécule renferme un atome de fer, lié au noyau tétrapyrrolique, qui peut réversiblement passer de l'état ferrique à l'état ferreux assurant ainsi un transfert d'électron

$$\text{Cyt Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Cyt Fe}^{2+} \; .$$

Les bandes d'absorption lumineuse sont nettement plus intenses pour les formes réduites que pour les formes oxydées. Ils sont généralement solidement fixés aux structures membranaires. Le cytochrome *c* fait exception ; facile à solubiliser et à purifier, sa structure est actuellement entièrement déterminée.

On distingue trois séries de cytochromes, repérées *a*, *b* et *c*, chacune comportant des variétés plus ou moins largement distribuées.

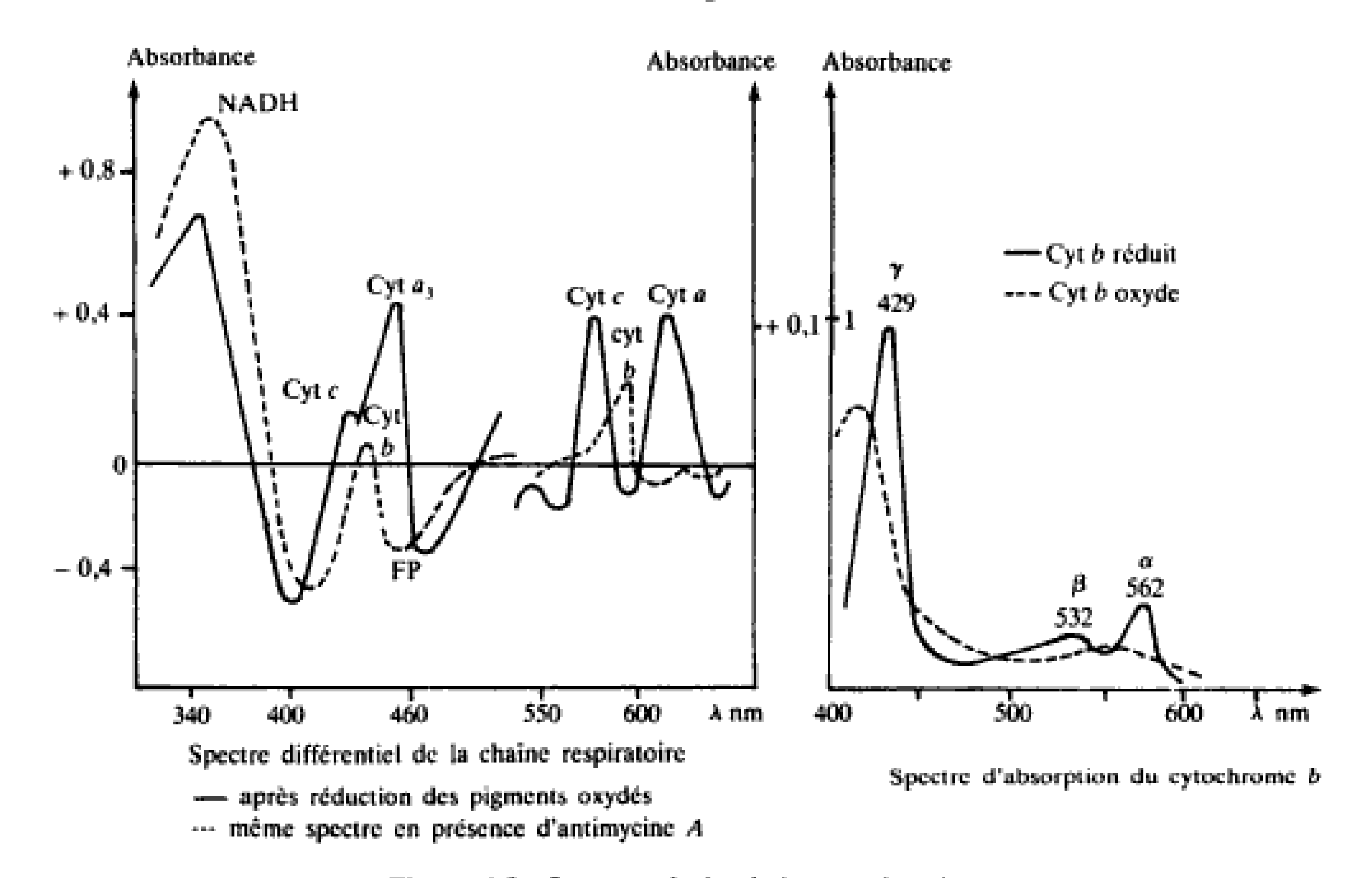


Figure 4.3 Spectres de la chaîne respiratoire.

Dans les mitochondries de mammifères ou de levures et chez certaines bactéries la chaîne cytochromique comprend :

• **Les cytochromes ($a + a_3$) ou cytochrome oxydase**

Les cytochromes ($a + a_3$) constituent le chaînon terminal des systèmes transporteurs d'électrons mitochondriaux, ils constituent un complexe appelé cytochrome oxydase, constitué de 2 sous-unités identiques et contenant des atomes de cuivre, les deux cytochromes *a* et a_3 ne diffèrent que par leurs spectres d'absorption.

Les cytochromes *a* et a_3 possèdent un groupement prosthétique appelé hème *A* différent de la ferroprotoprophyrine IX des cytochromes *b*, *c* et c_1 (fig. 4.4).

Le mécanisme par lequel O_2 est réduit par le cytochrome ($a + a_3$) est encore obscur : $O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \rightarrow 2\,H_2O$, il est cependant remarquable de constater que ce transporteur contient du cuivre comme de nombreuses oxygénases.

Il est vraisemblable que les électrons cédés par le cytochrome *c* sont directement acceptés par le cytochrome *a* puis transportés sur la sous-unité a_3 qui contient du cuivre.

Figure 4.4 Structure de l'hème *A* des cytochromes *a* et a_3.

Les cytochromes $a + a_3$ sont inhibés par le monoxyde de carbone (CO) et l'acide cyanhydrique (HCN).

- **Le cytochrome c.**

La structure du cytochrome *c* est bien connue, car soluble il a été extrait et purifié des préparations mitochondriales, c'est une hétéroprotéine de masse moléculaire 13 kDa, dont le groupement prosthétique est l'hème *C* ou ferroprotoporphyrine IX.

L'hème est lié à la protéine par deux liaisons thioéther (fig. 4.5).

Des différences apparaissent entre les cytochromes des espèces animales en ce qui concerne la nature et la séquence des acides aminés.

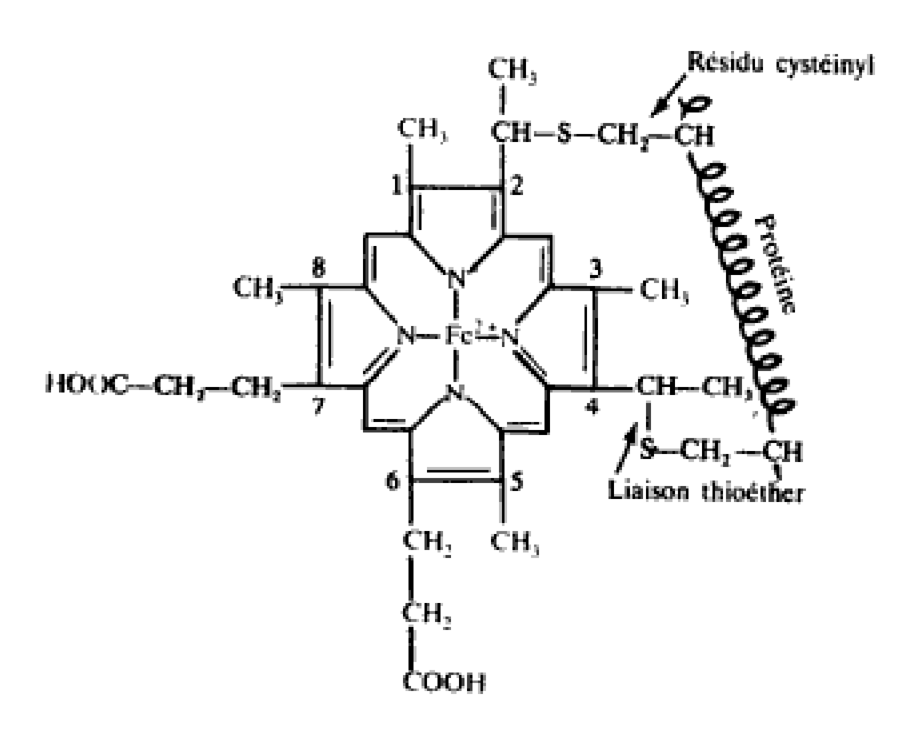


Figure 4.5 Structure de l'hème *C* des cytochromes *c* et c_1.

• **Les cytochromes *b* et c_1** sont solidement imbriqués dans la membrane interne mitochondriale. Dans le cytochrome c_1 l'hème est lié à la protéine comme dans le cytochrome *c*, en revanche la protéine du cytochrome *b* n'est pas liée par covalence au groupement prosthétique.

B. Les transferts d'électrons

L'ordre dans lequel se succèdent les transporteurs n'est pas quelconque. L'étude spectrophotométrique de l'équilibre des formes réduites et oxydées des transporteurs, la mesure des potentiels d'oxydoréduction et l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de chaque étape, ont permis de préciser l'évolution de cette chaîne.

Toutes les réactions de transfert de cette chaîne sont des réactions d'oxydoréduction du type :

$$ox_1 + red_2 \rightleftarrows red_1 + ox_2$$

$$\text{E-FMN} + \text{NADH, H}^+ \rightleftharpoons \text{E-FMNH}_2 + \text{NAD}^+$$

$$\text{Cyt } c\ Fe^{3+} + \text{Cyt } a\ Fe^{2+} \rightleftarrows \text{Cyt } c\ Fe^{2+} + \text{Cyt } a\ Fe^{3+}\ .$$

Elles correspondent toutes à un échange d'électrons (électrons seuls ou accompagnés de protons pour former de l'hydrogène) et peuvent être décomposées en deux couples redox :

$$ox_1 + n\,e^- \rightleftarrows red_1$$

$$red_2 - n\,e^- \rightleftarrows ox_2\ .$$

Ex. :

$$\text{Cyt } a\ Fe^{2+} - e^- \rightleftarrows \text{Cyt } a\ Fe^{3+}$$
$$\text{Cyt } c\ Fe^{3+} + e^- \rightleftarrows \text{Cyt } c\ Fe^{2+}$$
$$\overline{\text{Cyt } c\ Fe^{3+} + \text{Cyt } a\ Fe^{2+} \rightleftarrows \text{Cyt } a\ Fe^{3+} + \text{Cyt } c\ Fe^{2+}}$$

$$\text{E-FMN} + 2\,H^+ + 2\,e^- \rightleftarrows \text{E-FMNH}_2$$
$$\text{NADH} + H^+ - 2\,e^- \rightleftarrows \text{NAD}^+ + 2\,H^+$$
$$\overline{\text{E-FMN} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{E-FMNH}_2 + \text{NAD}^+}\ .$$

Les propriétés oxydantes ou réductrices de chaque couple sont déterminées par son aptitude à céder ou à capter des électrons.

Dans une pile pourvue d'électrodes convenables, on peut déterminer pour chaque couple redox un potentiel d'oxydoréduction *E* traduisant le pouvoir réducteur. On a choisi arbitrairement, pour fixer l'échelle des potentiels, le potentiel de l'électrode normale à hydrogène égal à 0. Soit $E = 0$ pour le couple redox :

$$1/2\ H_2 \rightarrow H^+ + e^-$$

dans les conditions : température = 25 °C, $(H^+) = 1$, $pH_2 = 1$ atm.

On peut alors définir, pour chaque autre couple x Ox $+ n\, e^- \rightleftharpoons y$ Red placé dans les conditions de référence (température 25 °C, activités des deux formes égales à l'unité), un potentiel standard ou potentiel normal, caractéristique du couple, et de la forme :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]^x}{[\text{Red}]^y}$$

avec E_0 le potentiel normal, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue, n le nombre d'électrons mis en jeu, F la constante de Faraday.

Pour les couples oxydoréducteurs biochimiques, l'activité en ions H^+ intervient très souvent et la température est généralement voisine de 30 °C. On calcule alors un potentiel normal physiologique symbolisé E_0' correspondant à 30 °C et pH = 7 (tableau 4.2).

Les valeurs de E_0' pour les différents transporteurs permettent de prévoir un ordre théorique de succession puisque le transfert doit se faire dans le sens des potentiels normaux croissants. Toutefois dans les conditions cellulaires, les activités des formes réduites et oxydées ne sont pas égales à l'unité et le potentiel d'oxydoréduction E de chaque couple est alors donné par la formule de Nernst :

$$E = E_0' + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(\text{ox})}{(\text{red})}.$$

L'évolution de la chaîne respiratoire qui peut être prévue à partir des potentiels d'oxydoréduction a été dans ses grandes lignes confirmée par les données spectrophotométriques et l'emploi des inhibiteurs spécifiques. Il ne faut toutefois pas perdre de vue que selon l'état de la cellule le rapport des formes oxydée et réduite peut être variable ce qui modifie la valeur du potentiel d'oxydoréduction du système (tableau 4.1).

Tableau 4.1 Répartition et état des transporteurs dans la mitochondrie (d'après Chance).

	$NAD^+ + NADP^+$	FP (FAD + FMN)	Cyt *b*	Cyt *c*	Cyt *a*
Concentration relative (Cyt *a* = 1)	19	3,6	0,9	1,7	1
Pourcentages à l'état réduit :					
— en aérobiose normale	53	20	16	6	< 4
— en aériobiose réduite (ADP limitant) .	90	21	17	7	0

Les données spectrophotométriques et l'emploi d'inhibiteurs spécifiques évoqués ci-dessus ont été perfectionnés par Chance, cet auteur a démontré que dans la mitochondrie en aérobiose et à l'équilibre, le transporteur qui se trouve à l'extrémité la plus réductrice prédomine sous forme réduite, alors que celui proche de l'O_2 prédomine sous forme oxydée.

Tableau 4.2 Caractéristiques des oxydoréductions de la chaîne respiratoire.

Système d'oxydoréduction	E'_0 V (pH 7,30 °C)	$\Delta E'_0$ V	$\Delta G^{\circ\prime}$ kJ/mol par paire d'électrons ($n = 2$)	Synthèse de liaison riche (1 ADP → 1 ATP)
$NAD^+ \rightleftarrows NADH + H^+$	− 0,32			
		+ 0,22	− 42,2	1 ~
$FP \rightleftarrows FP\ H_2$	− 0,1			
		+ 0,14	− 26,7	
2 Cyt *b* $Fe^{3+} \rightleftarrows$ 2 Cyt *b* Fe^{2+}	+ 0,04			
		+ 0,19	− 36,4	1 ~
2 Cyt c_1 $Fe^{3+} \rightleftarrows$ 2 Cyt c_1 Fe^{2+}	+ 0,23			
		+ 0,03	− 5,85	
2 Cyt *c* $Fe^{3+} \rightleftarrows$ 2 Cyt *c* Fe^{2+}	+ 0,26			
		+ 0,03	− 5,85	
2 Cyt *a* $Fe^{3+} \rightleftarrows$ 2 Cyt *a* Fe^{2+}	+ 0,29			
		+ 0,53	− 102,4	1 ~
$1/2\ O^2 \rightleftarrows O^{2-}$	+ 0,82			

Lorsque la chaîne est bloquée par un inhibiteur spécifique, les transporteurs situés en amont du point de blocage sont tous à l'état réduit, ceux situés en aval sont tous oxydés.

Ainsi l'antimycine *A* bloque la réoxydation du cytochrome *b* puisque les flavoprotéines, le coenzyme *Q* et le cytochrome *b* sont à l'état réduit tandis que les cytochromes *c*, c_1, *a* et a_3 sont à l'état oxydé.

L'amytal sodique, la roténone, la piéricidine bloquent la réoxydation de la FP_1 par le CoE *Q*, la FP_1 est à l'état réduit, le CoE *Q* et les cytochromes *b*, *c*, c_1, *a* et a_3 sont à l'état oxydé.

Le cyanure inhibe la réoxydation du cytochrome $(a + a_3)$ sur l'oxygène, les flavoprotéines, le CoE *Q*, les cytochromes *b*, *c*, c_1, *a* et a_3 sont à l'état réduit.

La séquence de la chaîne respiratoire mitochondriale est représentée dans la figure 4.6.

C. La phosphorylation oxydative

1. ASPECT THERMODYNAMIQUE

A chaque transfert correspond une variation d'enthalpie libre :

$$\Delta G = -\, n\, \mathrm{F}\, \Delta E$$

F représente le faraday, 96.500 C
n le nombre d'électrons transférés
ΔE la différence entre les potentiels redox des deux systèmes.

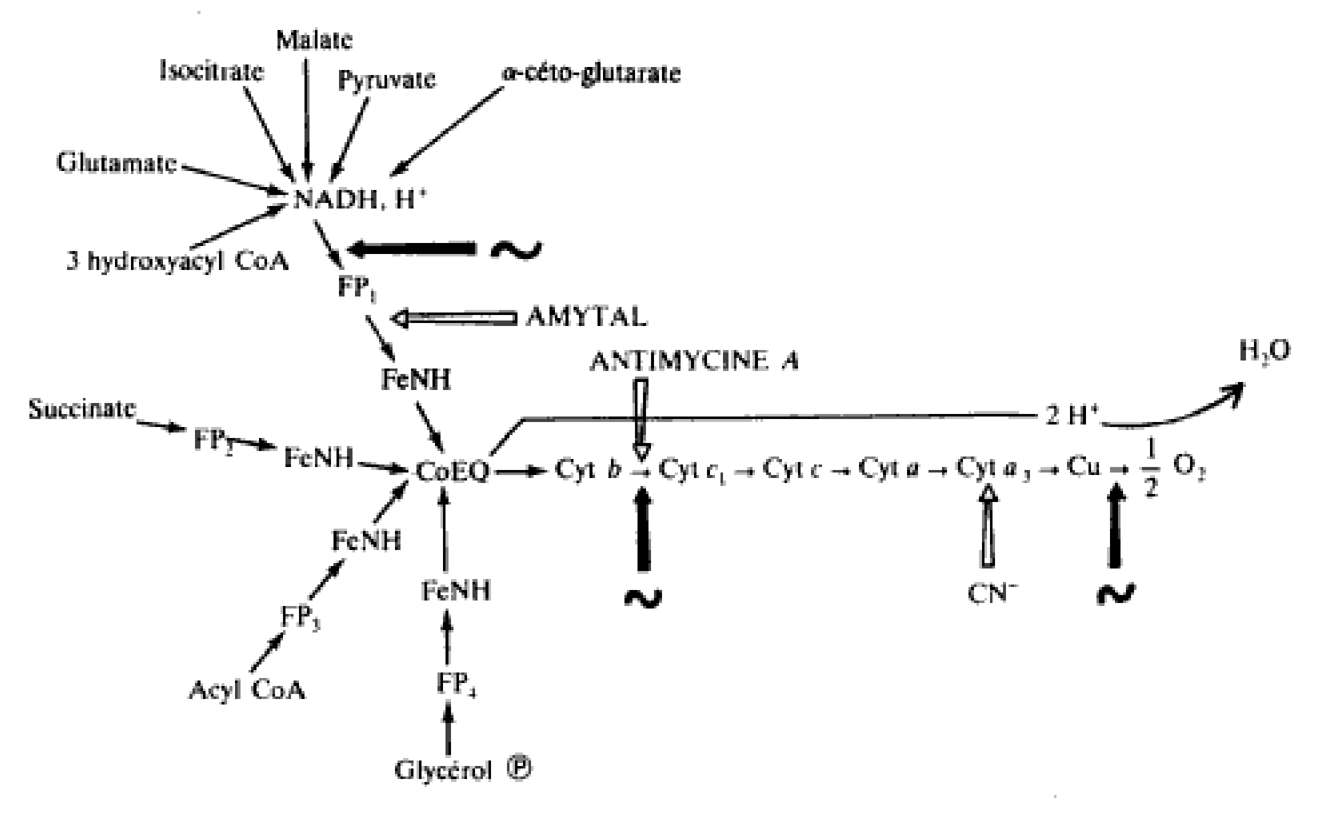


Figure 4.6 Séquence schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le signe ~ représente les réactions redox qui libèrent une quantité d'enthalpie suffisante pour permettre une phosphorylation.
Le signe ⇒ représente les points d'action de certains inhibiteurs.

Par exemple, si l'on considère l'oxydation d'une mole de NADH, H^+ dans la chaîne respiratoire, le bilan peut s'écrire

$$\text{NADH, H}^+ + O_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + H_2O$$

$$E'_{0\,\text{NAD}^+/\text{NADH, H}^+} = -0{,}32 \text{ V}$$

$$E'_{0\,O_2/H_2O} = +0{,}82 \text{ V}$$

$$\Delta E'_0 = (+0{,}82 \text{ V}) - (-0{,}32 \text{ V}) = +1{,}14 \text{ V}.$$

L'enthalpie libre standard est donc égale à :

$$\Delta G'_0 = -2 \times 96.500 \times 1{,}14 = -22.10^4 \text{ J} = -220 \text{ kJ/mol}.$$

Trois réactions de transfert d'électrons ont un $|\Delta G'_0| > 29{,}3$ kJ/mol

$$\text{NADH, H}^+ + F_{P_1} \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + F_{P_1}H_2$$

$$2 \text{ cyt } b \text{ Fe}^{2+} + 2 \text{ cyt } c_1 \text{ Fe}^{3+} \rightleftharpoons 2 \text{ cyt } b \text{ Fe}^{3+} + 2 \text{ cyt } c_1 \text{ Fe}^{2+}$$

$$2 \text{ cyt } a_3 \text{ Fe}^{2+} + 1/2\, O_2 \rightleftharpoons 2 \text{ cyt } a_3 \text{ Fe}^{3+} + O^{2-}.$$

A chacun de ces stades l'enthalpie libérée par la réaction d'oxydoréduction autorise la phosphorylation d'un ADP :

$$ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O \qquad \Delta G'_0 = +29{,}3 \text{ kJ/mol}$$

cette réaction étant endergonique ($\Delta G'_0 > 0$).

On parle, dans ce cas, d'**oxydation phosphorylante au niveau de la chaîne respiratoire** et c'est là l'essentiel de l'origine de l'énergie dérivant du catabolisme.

Une partie seulement de l'enthalpie libérée est récupérée sous forme de « liaison riche en énergie », le reste est dissipé sous forme de chaleur, le taux de récupération est égal à :

$$\rho = \frac{29{,}3 \times 3}{220} \times 100 \# 40\ \%.$$

2. LE RAPPORT P/O

A l'aide d'un appareil de Warburg ou d'un oxygraphe, on mesure le rapport P/O lorsque différents substrats sont oxydés par une suspension mitochondriale.

Le rapport P/O est celui du nombre de moles de phosphate inorganique (P) incorporé par phosphorylation au nombre de moles d'atomes d'oxygène (O) consommé :

P/O = 3 lorsque le NADH, H^+ est réoxydé
P/O = 2 quand le substrat est le succinate
P/O = 1 pour certains diphénols ou pour l'acide ascorbique qui réduisent directement le cytochrome *c*.

3. COUPLAGE ENTRE PHOSPHORYLATION ET TRANSFERT DES ÉLECTRONS

L'expérience de respiration contrôlée démontre l'existence de ce couplage (fig. 4.7).

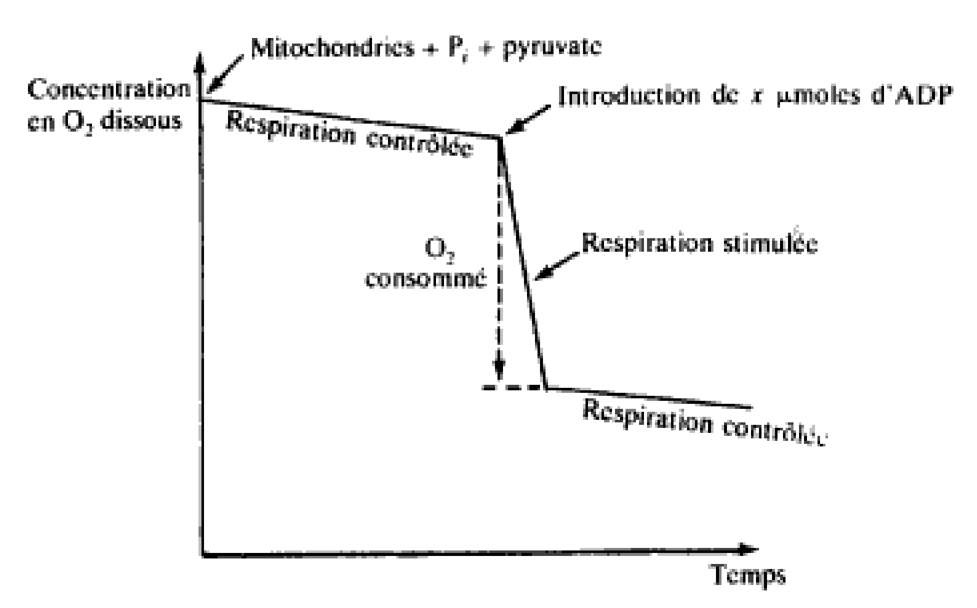


Figure 4.7 Expérience d'oxygraphie.
Cette expérience permet en outre de mesurer le rapport P/O ; la quantité d'ADP introduite en quantité connue permet de déterminer P, la mesure de l'oxygène dissous consommé permet de déterminer O.

On incube des mitochondries dans un milieu isotonique tamponné à pH 7,4, contenant du phosphate, du magnésium, saturé en oxygène et thermostaté.

On introduit dans cette suspension un substrat oxydable, comme du pyruvate, et l'on mesure la consommation d'oxygène dissous à l'aide d'une électrode de Clark. On constate que les mitochondries respirent lentement et pourtant, à première vue, toutes les conditions semblent réunies pour assurer une oxydation rapide du pyruvate. Si l'on ajoute une quantité limitée d'ADP, on observe une stimulation immédiate et temporaire de la respiration. La respiration stimulée cesse dès que l'ADP ajouté a été entièrement transformé en ATP.

L'expérience de respiration contrôlée puis stimulée permet de tirer deux conclusions, la première est qu'il existe un couplage entre transfert d'électrons et phosphorylation, puisque la **phosphorylation contrôle le transfert des électrons,** la seconde est que l'ADP est un activateur de la respiration mitochondriale.

Les découplants comme le 2-4 dinitrophénol ou le dicoumarol (fig. 4.8) sont des agents chimiques qui abolissent la phosphorylation tout en permettant aux oxydations de se poursuivre ; l'addition d'un découplant stimule le transfert des électrons

NO_2
HO — — NO_2
2-4 dinitrophénol

OH OH
Dicoumarol

Figure 4.8 Découplants.

La plupart des découplants sont des molécules liposolubles possédant un groupement acide faible (fonction phénol).

4. LE MÉCANISME DU COUPLAGE : LA THÉORIE CHIMIO-OSMOTIQUE DE MITCHELL

Cette théorie proposée en 1961 par un chercheur anglais, Peter Mitchell, et consacrée par un prix Nobel en 1978, suggère que le transport des électrons dans la chaîne respiratoire **éjecte des protons (H^+)** de la matrice mitochondriale vers l'extérieur et que le **gradient électrochimique** ainsi créé assure la synthèse d'ATP.

- **Arguments expérimentaux**

Un certain nombre d'arguments apportent une confirmation expérimentale à cette théorie :

— les découplants annulent le gradient de protons et suppriment la phosphorylation. Ces molécules agissent en transportant les ions H^+ grâce à leur fonction acide, au travers de la membrane mitochondriale qu'ils traversent grâce à leur liposolubilité ;

— la phosphorylation n'est possible que si l'intégrité de la membrane mitochondriale est respectée ;

— des mesures de pH fondées sur des techniques de RMN du phosphore ont permis d'établir que le pH extramitochondrial est inférieur de 1,4 unité au pH de la matrice.

• **Arguments thermodynamiques**

L'accumulation des protons crée un gradient électrochimique que l'on peut assimiler à un état stationnaire, le flux sortant étant compensé par le flux entrant. Ce gradient représente de l'énergie potentielle à la manière de l'eau accumulée dans un barrage hydroélectrique. Les protons, en réintégrant la matrice mitochondriale, traversent des sites particuliers de la membrane, appelés **ATP synthétase** qui permettent de convertir l'énergie du gradient en ATP.

Un calcul approché permet d'estimer la valeur du gradient exprimée en volts et la quantité d'enthalpie libérée par le transfert d'une mole de protons du compartiment extra- vers le compartiment intramitochondrial

$$\Delta V = \Delta \Pi - \frac{RT}{F} \Delta \, \mathrm{pH} \ ,$$

expression dans laquelle :

ΔV représente le gradient électrochimique de protons en volts.

$\Delta \Pi$ représente le potentiel de membrane qui est polarisée positive à l'extérieur et négative à l'intérieur $\Delta \Pi = 0{,}14$ V.

Δ pH représente le gradient de pH (acide à l'extérieur) : $\Delta \, \mathrm{pH} = -1{,}4$.

$$\Delta V = 0{,}14 - 0{,}058 \times (-1{,}4) = 0{,}224 \ \mathrm{V} \ .$$

La quantité d'enthalpie libérée par le transfert d'une mole de protons est égale à – 21,6 kJ/mol.

Sachant que l'enthalpie de synthèse d'une mole d'ATP est égale à + 29,3 kJ/mol, il faut le transfert d'une paire de protons pour que l'énergie libérée soit suffisante

$$\mathrm{ADP} + \mathrm{P}_i \rightarrow \mathrm{ATP} + \mathrm{H_2O} \qquad \Delta G'_0 = 29{,}3 \ \mathrm{kJ/mol}$$

• **Comment le gradient électrochimique de protons est-il créé ?**

En 1968, P. Mitchell postule que les transporteurs d'électrons sont orientés dans la membrane de telle façon que des protons soient pompés de façon univoque de la matrice vers l'extérieur.

Un certain nombre de modèles ont été proposés celui représenté sur la figure 4.9 prend en compte des données récentes, mais d'autres solutions restent vraisemblables.

• **Mécanisme de la synthèse d'ATP**

Au microscope électronique, une fraction de la membrane interne présente des formations particulières, appelées granules pédonculés, elles ont la forme d'une tige reliant une sphère de 9 nm à la membrane interne.

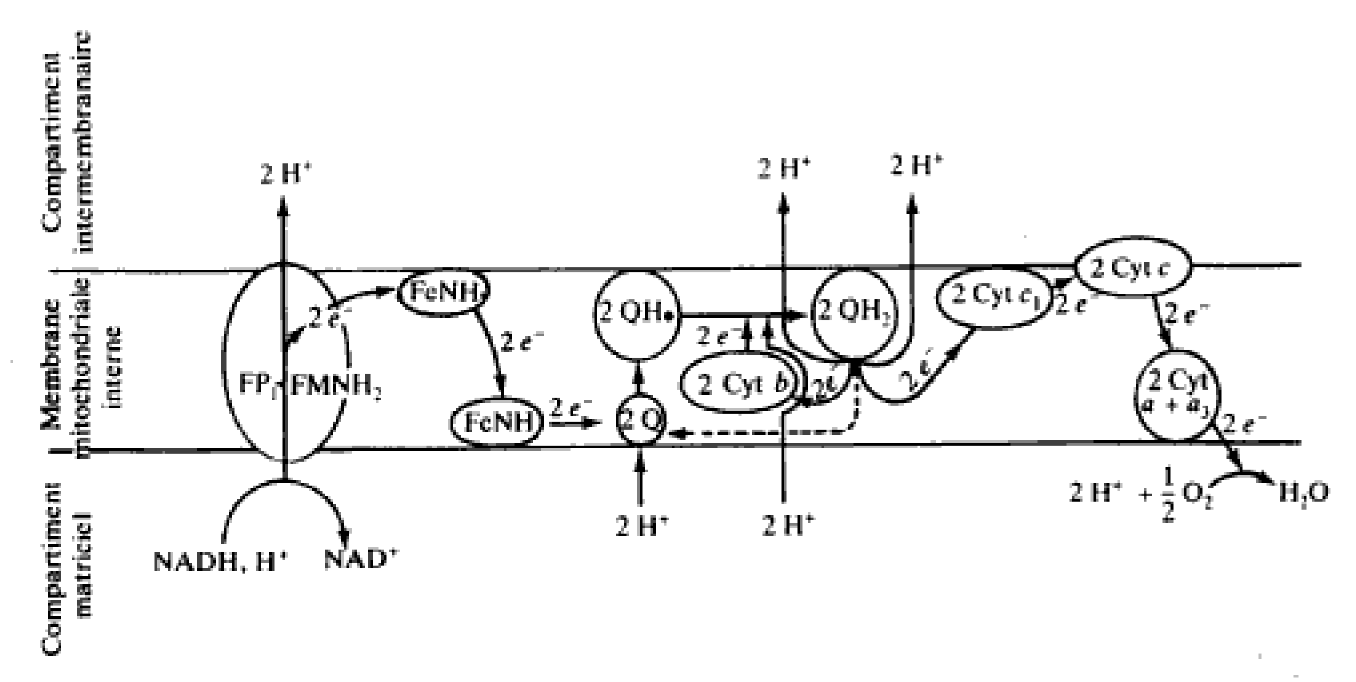


Figure 4.9 **Organisation des transporteurs membranaires mitochondriaux.**

Le NADH, H^+ intramitochondrial réduit la FP_1 membranaire. La FP_1-$FMNH_2$ se réoxyde en éjectant une paire de protons vers le compartiment extramitochondrial et en cédant deux électrons à des protéines à fer non héminique (FeNH) puis à l'ubiquinone *Q*. Ce coenzyme mobile dans la membrane du fait de sa liposolubilité joue un rôle primordial. Deux électrons sont captés par deux molécules de coenzyme *Q*, deux protons sont pompés dans la matrice mitochondriale, les deux molécules d'ubiquinone sont sous forme semi-quinonique (*Q* H•). Une semi-quinone après avoir accepté un électron de cytochrome *b* et un proton pompé dans la matrice se transforme en quinone réduite $Q\ H_2$. Chaque hydroquinone cède un électron au cytochrome c_1 et restitue un électron au cytochrome *b*, deux paires de protons sont éjectés. Les deux électrons sont ensuite envoyés sur l'oxygène par les cytochromes *c*, *a* et a_3.

Un traitement aux ultra-sons et à la trypsine permet d'obtenir des vésicules mitochondriales dépourvues de ces structures, elles assurent le transport des électrons, mais la synthèse d'ATP est abolie.

Ces granules représentent le complexe F_0-F_1 ou ATP synthétase, constitué de deux sous-unités reliées par une tige protéique : le facteur de couplage F_1 responsable de la synthèse d'ATP et la sous-unité F_0, solidement imbriquée dans la membrane, à rôle protonophore (fig. 4.10).

Le mécanisme de cette synthèse n'est pas totalement élucidé. Lorsqu'une paire de protons traverse la sous-unité F_0, il se produirait un changement de conformation dans le complexe F_0-F_1. Cette transconformation correspondrait à un état activé, l'énergie du transfert serait convertie sous une forme mécanique, puis transformée en énergie chimique par synthèse d'ATP.

• **Régulation de la respiration mitochondriale**

Dans les conditions métaboliques normales, la chaîne respiratoire n'atteint pas sa vitesse maximale, la respiration est adaptée aux besoins de la cellule.

Le facteur régulateur le plus important est le taux d'ADP (fig. 4.7). Une forte consommation d'ATP fait apparaître un taux élevé d'ADP, la respiration est stimulée.

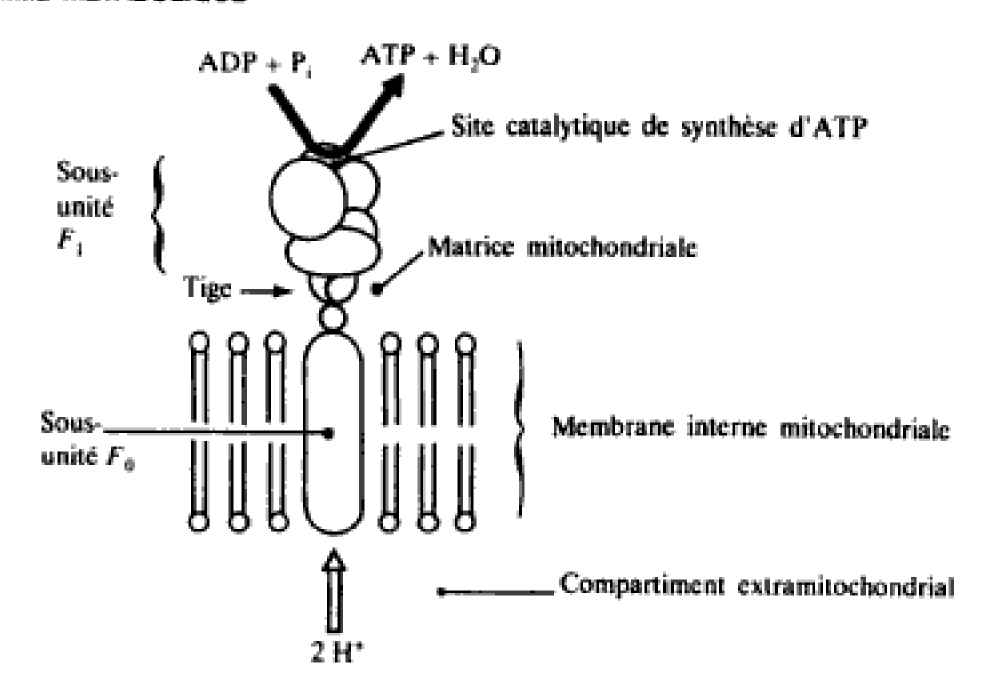


Figure 4.10 L'ATP synthétase.

D. La perméabilité de la membrane interne mitochondriale

La membrane externe mitochondriale est perméable à la quasi-totalité des métabolites, en revanche, la membrane est imperméable à la plupart des ions et des molécules.

Des questions relatives aux transferts et liées au fonctionnement de la chaîne respiratoire se posent dès lors de façon très claire :

— le NADH, H^+ produit dans le cytosol au cours de la glycolyse est réoxydé dans la chaîne respiratoire bien que la membrane interne mitochondriale soit imperméable au NADH, H^+ et au NAD^+,

— l'ATP synthétisé dans la mitochondrie est utilisé dans le cytoplasme, ceci malgré l'imperméabilité de la membrane à l'ATP et à l'ADP.

1. LES NAVETTES TRANSMEMBRANAIRES À HYDROGÈNE

Les électrons accompagnés de protons du NADH, H^+ pénètrent dans la mitochondrie associés à des molécules appelées **navettes,** pour lesquelles il existe des transporteurs enzymatiques.

- **La navette glycérol phosphate** (fig. 4.11)

La glycérol phosphate déshydrogénase cytoplasmique réduit le dihydroxyacétone P (DHAP) en captant les deux électrons et les deux protons du NADH, H^+, le glycérol phosphate traverse la membrane mitochondriale ; dans la mitochondrie, cette molécule est réoxydée par la FP_4. Le bilan en ATP est de deux ATP formés pour un NADH, H^+ cytoplasmique réoxydé.

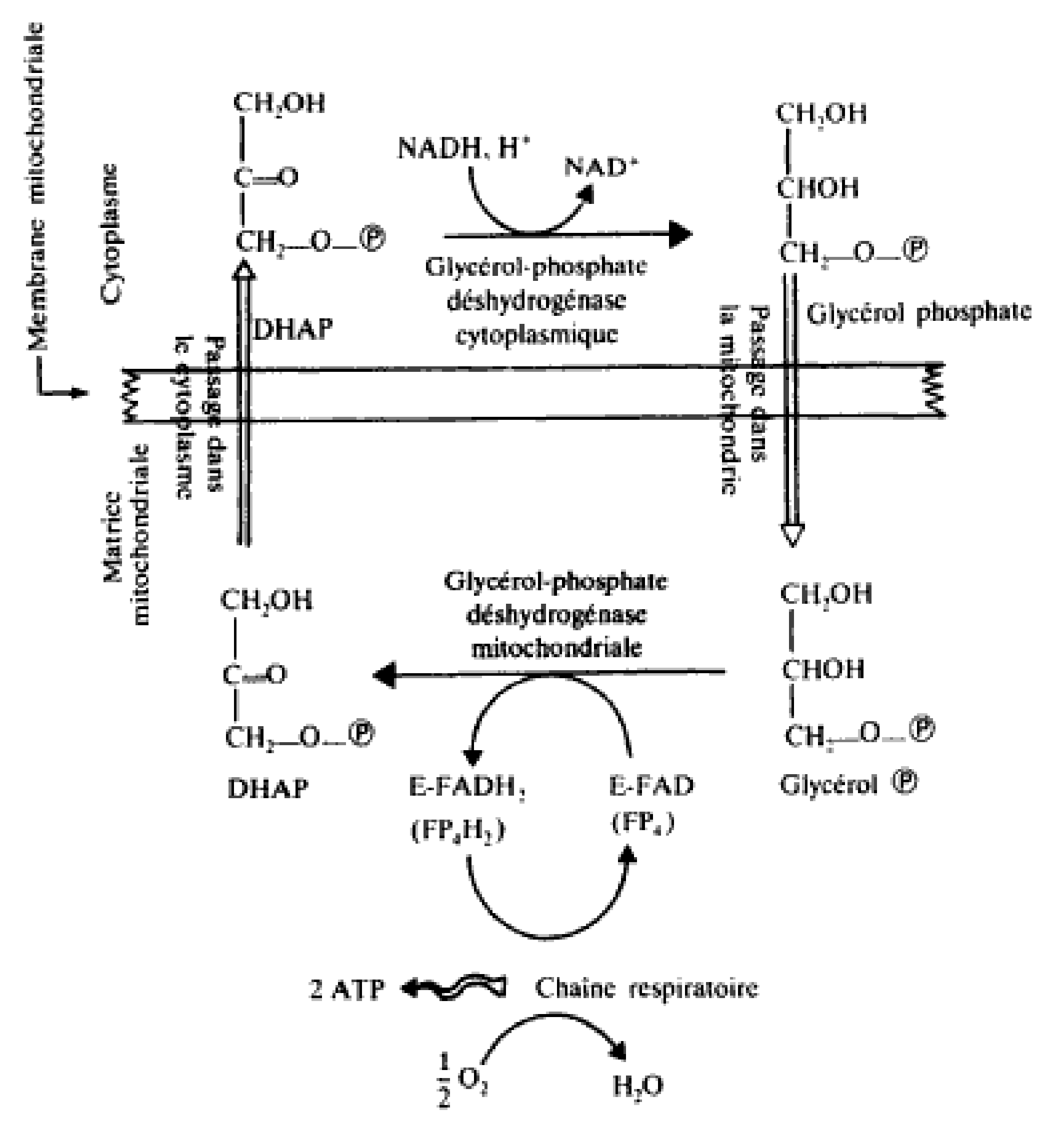


Figure 4.11 La navette glycérol phosphate.

- **La navette malate-aspartate** (fig. 4.12)

L'oxaloacétate cytoplasmique sous l'effet de la malate déshydrogénase capte les deux électrons et les deux protons du NADH, H^+, le malate qui en résulte traverse la membrane mitochondriale et passe dans la matrice.

Une malate déshydrogénase réoxyde ce métabolite en réduisant un NAD^+ en NADH, H^+.

L'oxaloacétate produit de cette réaction traversant mal la membrane est exporté dans le cytoplasme sous forme d'aspartate après une réaction de transamination. Cette navette, à la différence de celle du glycéraldéhyde phosphate est réversible et ne consomme pas d'énergie, la réoxydation d'un NADH, H^+ cytoplasmique produit 3 ATP.

2. L'ADÉNYL NUCLÉOTIDE TRANSLOCASE

Ce transporteur enzymatique, localisé dans la membrane interne, assure un échange-diffusion.

L'entrée d'un ADP dans la mitochondrie requiert la sortie d'un ATP.

Ce phénomène n'est pas une diffusion sous le seul effet du gradient de concentration, puisque les activités ne sont pas égales dans les deux compartiments.

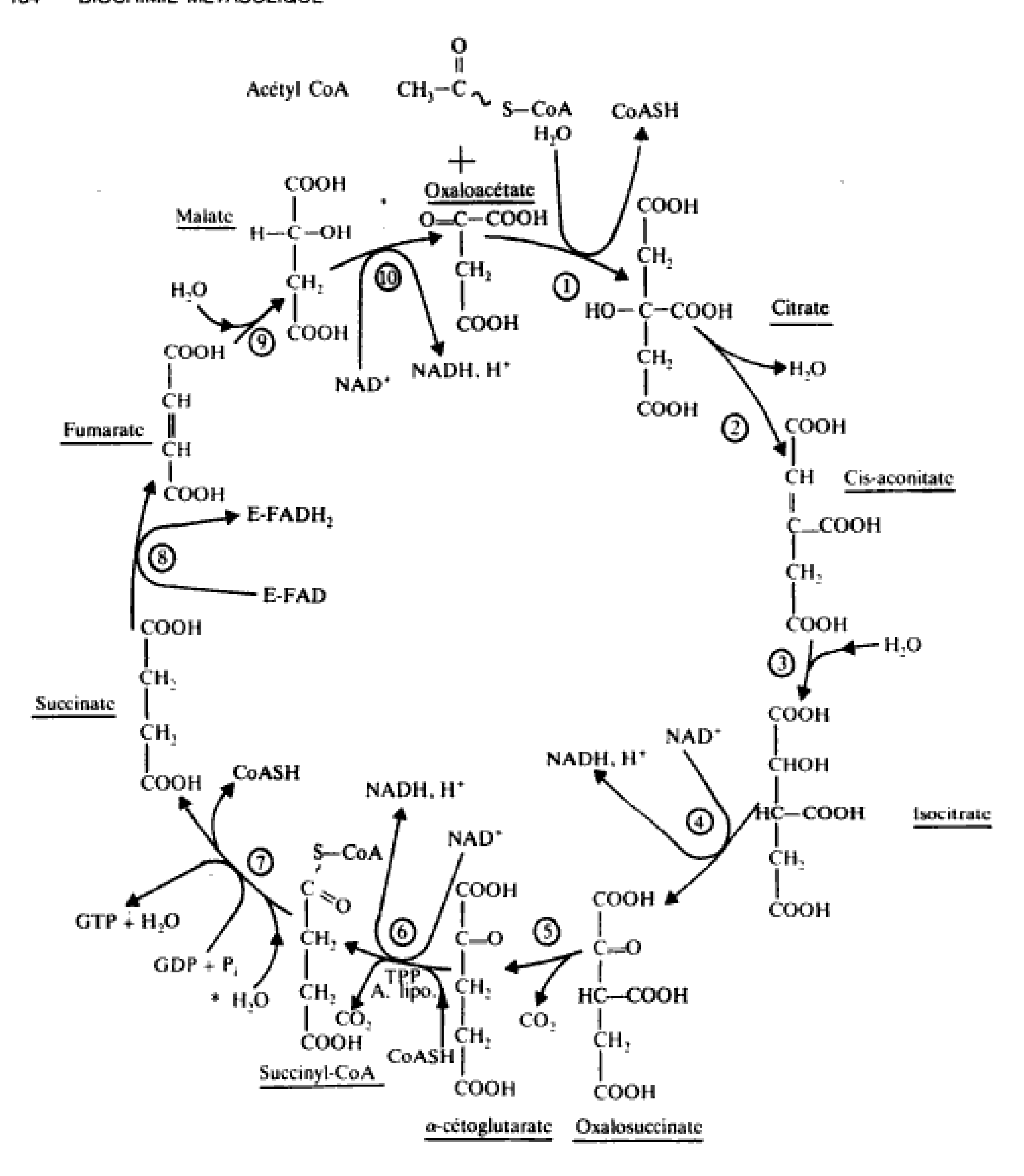


Figure 5.1 Le cycle de Krebs.

1. Citrate synthétase
2. Aconitase
3. Aconitase
4. Isocitrate-déshydrogénase
5. Isocitrate-déshydrogénase
6. α-cétoglutarate déshydrogénase
7. Succinyl-CoA-synthétase
8. Succinate-déshydrogénase
9. Fumarase
10. Malate-déshydrogénase

* Cette molécule d'eau est écrite pour équilibrer le bilan, mais n'intervient pas dans le mécanisme de la réaction.

citrate synthétase, isocitrate déshydrogénase, α-cétoglutarate déshydrogénase, succinyl-CoA synthétase, fumarase, malate déshydrogénase, ou liés à la membrane interne mitochondriale : aconitase, succinate déshydrogénase.

Certaines des enzymes du cycle n'existent pas seulement dans la mitochondrie, mais également dans le cytoplasme : l'aconitase, l'isocitrate déshydrogénase $NADP^+$ spécifique, la fumarase, la malate déshydrogénase.

B. Etude des étapes du cycle

1. LA FORMATION DU CITRATE

Le citrate est formé par condensation de l'acétyl CoA avec l'oxaloacétate, la réaction est catalysée par la citrate synthétase. Le citryl CoA, intermédiaire de la réaction reste lié à l'enzyme

$CH_3-C(=O)\sim SCoA$ (Acétyl CoA) + $O=C(COOH)-CH_2-COOH$ (Oxaloacétate) ⇌ [$O=C\sim SCoA-CH_2-C(OH)(COOH)-CH_2-COOH$] $\xrightarrow{H_2O \;\rightarrow\; HSCoA}$ $COOH-CH_2-C(OH)(COOH)-CH_2-COOH$ (Citrate)

Citryl CoA lié à l'enzyme (la citrate synthétase)

2. L'ISOMÉRISATION DU CITRATE

L'isomérisation du citrate en isocitrate, catalysée par l'aconitase, est réalisée par une déshydratation suivie d'une hydratation.

$COOH-CH_2-C(OH)(COOH)-CH_2-COOH$ (citrate 91 %) $\underset{}{\overset{-H_2O}{\rightleftharpoons}}$ $COOH-CH_2-C(COOH)=CH-COOH$ (cis-aconitate 3 %) $\overset{+H_2O}{\rightleftharpoons}$ $COOH-CH_2-CH(COOH)-CH(OH)-COOH$ (isocitrate 6 %)

A l'équilibre, il y a peu d'isocitrate (6 %) dans la cellule, devant la quantité de citrate (91 %), mais la réaction évolue cependant vers la droite car c'est l'isocitrate qui subit les réactions de transformation du cycle.

3. L'OXYDATION DE L'ISOCITRATE

L'isocitrate est oxydé et décarboxylé en α-cétoglutarate (2-oxo-glutarate), la réaction est catalysée par l'isocitrate déshydrogénase.

$$\underset{\text{isocitrate}}{HOOC-CH_2-CH(COOH)-CH(OH)-COOH} \xrightarrow{NAD^+ \rightarrow NADH, H^+} \underset{\text{oxalosuccinate}}{HOOC-CH_2-CH(COOH)-CO-COOH} \xrightarrow{-CO_2} \underset{\alpha\text{-cétoglutarate}}{HOOC-CH_2-CH_2-CO-COOH}$$

Il existe deux types d'isocitrate déshydrogénase, les enzymes mitochondriales sont à NAD^+ et à $NADP^+$, l'enzyme cytoplasmique est à $NADP^+$. C'est l'enzyme à NAD^+ qui joue le rôle essentiel dans le cycle de Krebs, les enzymes à $NADP^+$ assurent une autre fonction.

4. DÉCARBOXYLATION OXYDATIVE DE L'α-CÉTOGLUTARATE

La décarboxylation de l'α-cétoglutarate est catalysée par l'α-cétoglutarate déshydrogénase. Ce complexe multienzymatique de masse moléculaire élevée ($2{,}1 . 10^6$ daltons chez *E. coli*) fait intervenir quatre coenzymes (*)

$$\underset{\alpha\text{-cétoglutarate}}{HOOC-CH_2-CH_2-CO-COOH} + HSCoA \xrightarrow[\text{TPP, acide lipoïque}]{NAD^+ \rightarrow NADH, H^+} \underset{\text{succinyl CoA}}{HOOC-CH_2-CH_2-C(=O)\sim SCoA} + CO_2$$

Le mécanisme de cette réaction a été décrit figure 3.55, page 106.

5. LA TRANSFORMATION DU SUCCINYL CoA EN SUCCINATE

La conversion du succinyl CoA, composé riche en énergie, en succinate s'accompagne du transfert de l'énergie de la liaison thioester sur le GTP. La réaction est catalysée par une succinyl CoA-synthétase.

(*) En réalité cinq coenzymes interviennent, puisque l'on a mis en évidence la fonction d'un FAD sous forme semi-quinonique.

Le bilan de cette réaction peut s'écrire :

$$\text{CH}_2(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\sim\text{SCoA} + H_2O \xrightarrow{\text{succinyl-CoA synthétase}} \text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} + \text{HSCoA}$$

GDP + P_i → GTP + H_2O

GTP + ADP → GDP + ATP (nucléoside diphosphokinase, Mg^{2+})

Le mécanisme de la réaction fait intervenir un intermédiaire phosphorylé de l'enzyme :

Succinyl CoA + E ⟶ E ~ SCoA + succinate

E ~ SCoA + P_i ⟶ E ~ Ⓟ + CoASH

E ~ Ⓟ + GDP ⟶ E + GTP

Le GTP formé permet la synthèse d'ATP, grâce à une transphosphorylation catalysée par une nucléoside diphosphokinase. Cette phosphorylation au niveau du cycle de Krebs se différencie en tous points de celle de la chaîne respiratoire.

6. L'OXYDATION DU SUCCINATE

Le succinate est déshydrogéné en fumarate, la succinate déshydrogénase (FP_2) est une flavoprotéine à FAD (p. 118), liée à des protéines fer-soufre.

$$\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \xrightarrow{\text{E-FAD} \to \text{E-FADH}_2} \text{COOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$$

succinate → fumarate

$\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$: malonate (Inhibiteur compétitif)

Cette enzyme est inhibée compétitivement par le malonate (p. 67) ; une suspension mitochondriale, en présence de pyruvate en milieu tamponné, est empoisonnée par cet inhibiteur avec accumulation de citrate dans le milieu.

7. HYDRATATION DU FUMARATE

L'hydratation du fumarate en *L*-malate est catalysée par la fumarase.

$$\text{COOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH} + H_2O \xrightarrow{\text{fumarase}} \text{COOH}-\text{C}(\text{HO})(\text{H})-\text{CH}_2-\text{COOH}$$

fumarate → malate

La réaction est réversible.

8. L'OXYDATION DU MALATE

La dernière réaction du cycle de Krebs est une oxydation du malate en oxaloacétate, catalysée par la malate déshydrogénase, enzyme à NAD^+.

$$HOOC-CHOH-CH_2-COOH \xrightarrow[NAD^+ \to NADH, H^+]{MDH} HOOC-CO-CH_2-COOH$$

malate → oxaloacétate

Cette réaction est réversible, l'utilisation de l'oxaloacétate déplace l'équilibre vers la droite.

Conclusion

Le bilan simplifié d'un tour de cycle de Krebs est simple à établir :

— deux décarboxylations : 2 CO_2 sont rejetés,
— quatre déshydrogénations : réduction de 3 NAD^+, et d'un FAD,
— une liaison riche en énergie est créée.

Des expériences de marquage isotopique ont démontré que les 2 molécules de CO_2 ne proviennent pas de l'acétyl CoA, mais de l'oxaloacétate.

C. Bilans du cycle

1. BILAN MOLÉCULAIRE

On peut faire le bilan du cycle de Krebs sous forme d'une réaction globale en additionnant membre à membre chacune des réactions du cycle :

$$CH_3CO \sim SCoA + 2\,H_2O + GDP + H_3PO_4 + 3\,NAD^+ + FAD \rightarrow$$
$$\rightarrow CoASH + 2\,CO_2 + GTP + 3\,NADH, H^+ + FADH_2\,.$$

En simplifiant l'écriture, le bilan devient :

$$CH_3-CO\sim SCoA + 3\,H_2O \xrightarrow[GDP + H_3PO_4 \to GTP + H_2O]{} 8[H] + HSCoA + 2\,CO_2$$

2. BILAN ÉNERGÉTIQUE

L'oxydation complète d'une molécule d'acétyl-coenzyme *A* permet la synthèse de 3 NADH, H^+ qui réoxydés dans la chaîne respiratoire créent 3 fois 3 soit 9 ATP, un $FADH_2$ qui réoxydé libère 2 ATP, plus un GTP créé au niveau de la réaction de conversion du succinyl CoA en succinate.

Soit un bilan de 12 ATP synthétisés par mole d'acétyl coenzyme A.

D. Place du cycle de Krebs dans le métabolisme intermédiaire

1. ORIGINE DE L'ACÉTYL COENZYME A

• **Origine glucidique**

Le catabolisme glucidique aboutit à un métabolite commun : le pyruvate. La décarboxylation oxydative de cette molécule produit de l'acétyl CoA, la réaction est catalysée par un complexe multienzymatique : la pyruvate déshydrogénase. Le mécanisme de cette réaction a été décrit page 106.

$$\underset{\text{pyruvate}}{CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH} + HS\text{-}CoA \xrightarrow[\text{TPP, acide lipoïque; } NAD^+ \rightarrow NADH, H^+]{\text{Pyruvate déshydrogénase}} CO_2 + CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SCoA$$

• **Origine lipidique**

Les acides gras sont dégradés par une voie métabolique appelée hélice de Lynen, à chacun des tours de spire de cette voie catabolique, un chaînon bicarboné est enlevé sous forme d'acétyl CoA (p. 185).

• **Origine protidique**

Du point de vue de leur catabolisme les acides aminés peuvent être classés en deux catégories :

— les acides aminés glucoformateurs qui rejoignent le métabolisme glucidique,
— les acides aminés cétogènes dont le catabolisme aboutit à l'acétyl CoA.

Certains acides aminés sont à la fois glucoformateurs et cétogènes.

2. DÉPART DE CHAÎNONS CARBONÉS VERS LES VOIES DE SYNTHÈSE

A côté du rôle énergétique assuré par le cycle de Krebs, coexiste une autre fonction, certains intermédiaires du cycle peuvent servir de précurseurs pour la biosynthèse de certains acides aminés.

Ainsi l'α-cétoglutarate est transaminé en acide glutamique, lui-même précurseur de la *proline* et de *l'arginine*.

$$\underset{\alpha\text{-cétoglutarate}}{COOH-CO-CH_2-CH_2-COOH} + \underset{\text{alanine}}{COOH-CH(NH_2)-CH_3} \xrightarrow{\text{ALAT*}} \underset{\text{glutamate}}{COOH-CH(NH_2)-CH_2-CH_2-COOH} + \underset{\text{pyruvate}}{COOH-CO-CH_3}$$

(*) ALAT : alanine aminotransférase.

L'oxaloacétate est transaminé en acide aspartique, lui-même précurseur de la lysine, de la thréonine, de la β-alanine et des bases puriques et pyrimidiques.

$$\begin{array}{c}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_2\\|\\COOH\\ \text{oxaloacétate}\end{array} + \begin{array}{c}COOH\\|\\NH_2{-}C{-}H\\|\\CH_2\\|\\CH_2\\|\\COOH\\ \text{glutamate}\end{array} \xrightarrow{\text{ASAT*}} \begin{array}{c}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_2\\|\\CH_2\\|\\COOH\\ \alpha\text{-cétoglutarate}\end{array} + \begin{array}{c}COOH\\|\\NH_2{-}C{-}H\\|\\CH_2\\|\\COOH\\ \text{aspartate}\end{array}$$

3. LES RÉACTIONS ANAPLÉROTIQUES DU CYCLE DE KREBS

Les prélèvements que fait la cellule sur les métabolites du cycle de Krebs sont compensés par des réactions « nourricières » appelées réactions anaplérotiques.

• **Carboxylation du pyruvate**

La réaction se déroule dans la mitochondrie, catalysée par la pyruvate carboxylase. Un ATP est hydrolysé pour fournir l'énergie à la synthèse d'une liaison C—C.

$$\begin{array}{c}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_3\\ \text{pyruvate}\end{array} + CO_2 \xrightarrow[\text{ATP + H}_2\text{O} \;\rightarrow\; \text{ADP + P}_i]{\text{Pyruvate carboxylase}} \begin{array}{c}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_2\\|\\COOH\\ \text{oxaloacétate}\end{array}$$

• **Carboxylation du phosphoénol-pyruvate (PEP)**

Le PEP métabolite de la glycolyse (p. 151) est un composé riche en énergie, l'enthalpie libre d'hydrolyse de la liaison énol-phosphate est telle que non seulement elle ne nécessite pas d'apport énergétique supplémentaire, mais permet en plus la synthèse d'un GTP. La réaction est catalysée par une PEP carboxykinase.

$$\begin{array}{c}COOH\\|\\C{\sim}O{-}\text{Ⓟ}\\\|\\CH_2\end{array} + CO_2 + GDP \xrightarrow{\text{PEP carboxykinase}} \begin{array}{c}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_2\\|\\COOH\end{array} + GTP$$

E. La régulation du cycle de Krebs

La vitesse du cycle de Krebs est adaptée aux besoins énergétiques de la cellule, outre un mécanisme physicochimique fondé sur les lois de déplacement des équilibres il existe un contrôle enzymatique de l'activité de cette voie.

(*) ASAT : aspartate aminotransférase.

Trois étapes du cycle de Krebs sont des points de régulation :

- **La citrate synthétase** est une enzyme allostérique inhibée par l'ATP. C'est un exemple qui illustre bien le rétro-contrôle d'une voie par action d'un effecteur (on peut considérer l'ATP comme le produit final de cette voie) sur la première enzyme.

- **L'isocitrate déshydrogénase à NAD^+** est activée allostériquement par l'ADP, ce qui revient à fortement diminuer la vitesse d'oxydation de l'isocitrate lorsque la charge en ATP de la mitochondrie est importante.

- **L'α-cétoglutarate déshydrogénase** est inhibée par le succinyl CoA, produit de la réaction qu'elle catalyse et par le NADH, H^+.

Compte tenu de l'importance du catabolisme glucidique dans le métabolisme cellulaire, on est amené à étudier la régulation de l'approvisionnement du cycle de Krebs en acétyl CoA issu de la décarboxylation oxydative du pyruvate (p. 106).

Cette réaction est catalysée par un complexe multienzymatique appelé pyruvate déshydrogénase.

Ce système enzymatique existe sous forme inactive phosphorylée (dans cette forme inactive un résidu séryl est phosphorylé) et sous forme active déphosphorylée.

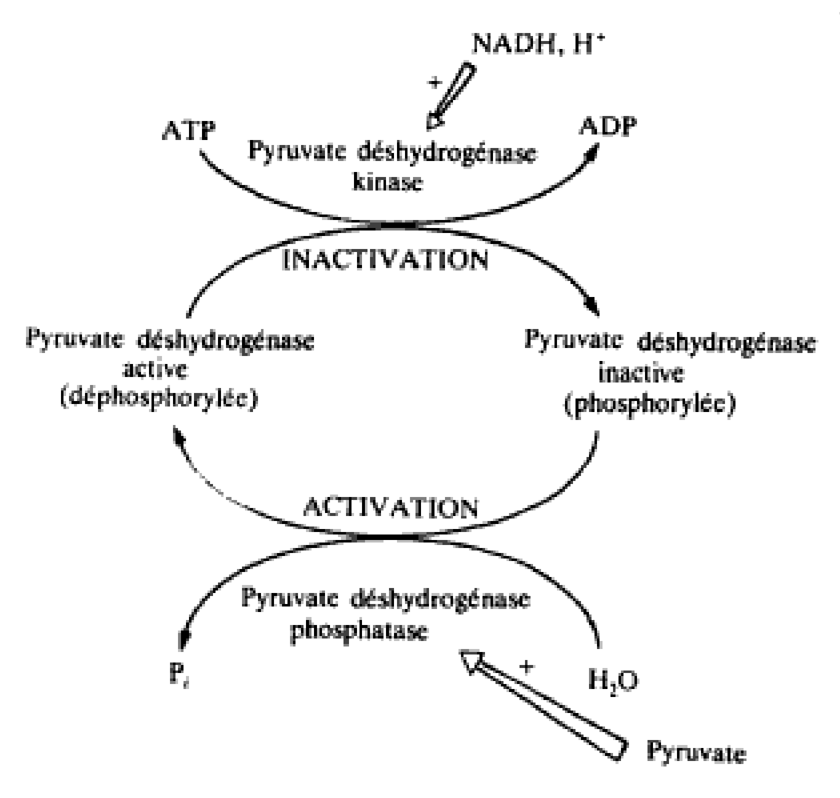


Figure 5.2 Régulation de la pyruvate déshydrogénase.

La phosphorylation de l'enzyme, par transfert d'un phosphate provenant de l'ATP, est catalysée par une sous-unité enzymatique du complexe lui-même, appelée pyruvate déshydrogénase kinase, dont l'activité est contrôlée par plusieurs modulateurs, le plus important étant une activation par le NADH, H^+.

De même, l'activation par déphosphorylation est catalysée par une phosphatase, sous-unité du complexe multienzymatique, contrôlée par le pyruvate qui l'active.

6

Le métabolisme glucidique

Les nombreuses réactions du métabolisme intermédiaire (une seule cellule peut renfermer plusieurs centaines d'enzymes) n'évoluent pas isolément, elles sont regroupées selon certaines voies assurant la transformation des substrats.

Toute voie, anabolique ou catabolique, est une succession complexe de réactions faisant intervenir, outre les substrats, des enzymes et leurs coenzymes ainsi qu'éventuellement des composés énergétiques.

Dans chacune de ces voies, il est possible de distinguer deux phases :

— une *phase spécifique,* dans laquelle les composés métabolisés renferment quatre atomes de carbone ou plus et possèdent la structure caractéristique de leur groupe (structures glucidique, lipidique, protidique) ;

— une *phase commune,* dans laquelle les substrats, qui comportent généralement moins de quatre atomes de carbone, sont communs à plusieurs voies et permettent des passages de l'une à l'autre. Ces substrats communs comme le pyruvate et l'acétyl-coenzyme *A* sont encore appelés des *carrefours* ou des *plaques tournantes* du métabolisme. Au cours de cette phase des réactions de condensation peuvent toutefois conduire à des composés communs ayant un nombre plus élevé d'atomes de carbone.

Les divers métabolismes ont des localisations cellulaires différentes, mais ils sont liés les uns aux autres par l'aspect énergétique, les substrats communs et les phénomènes de régulation.

Les métabolismes glucidiques (fig. 6.1) et lipidiques sont essentiellement énergétiques, le métabolisme azoté (nucléique et protéique) est structural, fonctionnel et vecteur d'information.

Cette subdivision, qui rappelle la distinction entre les aliments énergétiques et les aliments plastiques, est elle-même imparfaite puisque les copules carbonées d'aminoacides peuvent avoir un rôle énergétique et que la cellulose, les lipides complexes, etc., sont des constituants de structure de la matière vivante.

I. LA GLYCOLYSE

Les glucides, le glucose en particulier, représentent pour l'ensemble des organismes, qu'ils soient autotrophes ou hétérotrophes, la source d'énergie chimique fondamentale, facilement et rapidement mobilisable.

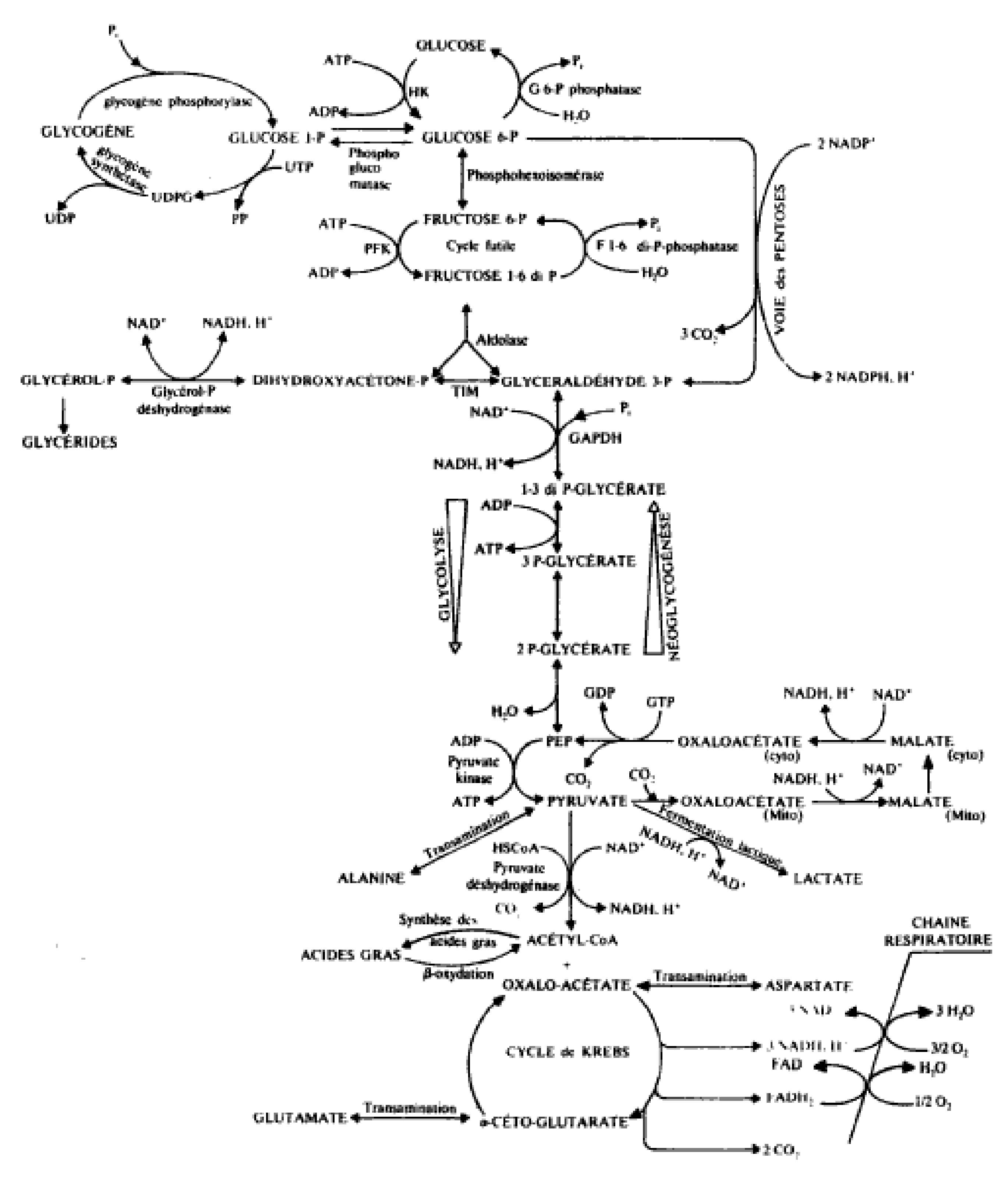


Figure 6.1 Vue d'ensemble du métabolisme glucidique dans la cellule animale.

Les *nutriments glucidiques* sont essentiellement des *hexoses* (glucose, fructose, galactose, mannose) qui ne sont métabolisés qu'après activation sous forme d'esters phosphoriques ou hexoses-phosphates. De même, les *formes de réserve comme le glycogène et l'amidon* font intervenir dans leur métabolisme les dérivés phosphorylés. Les enzymes du type *amylase* n'ont en effet pratiquement pas de rôle au niveau cellulaire à quelques exceptions près : graines en germination, digestion du glycogène

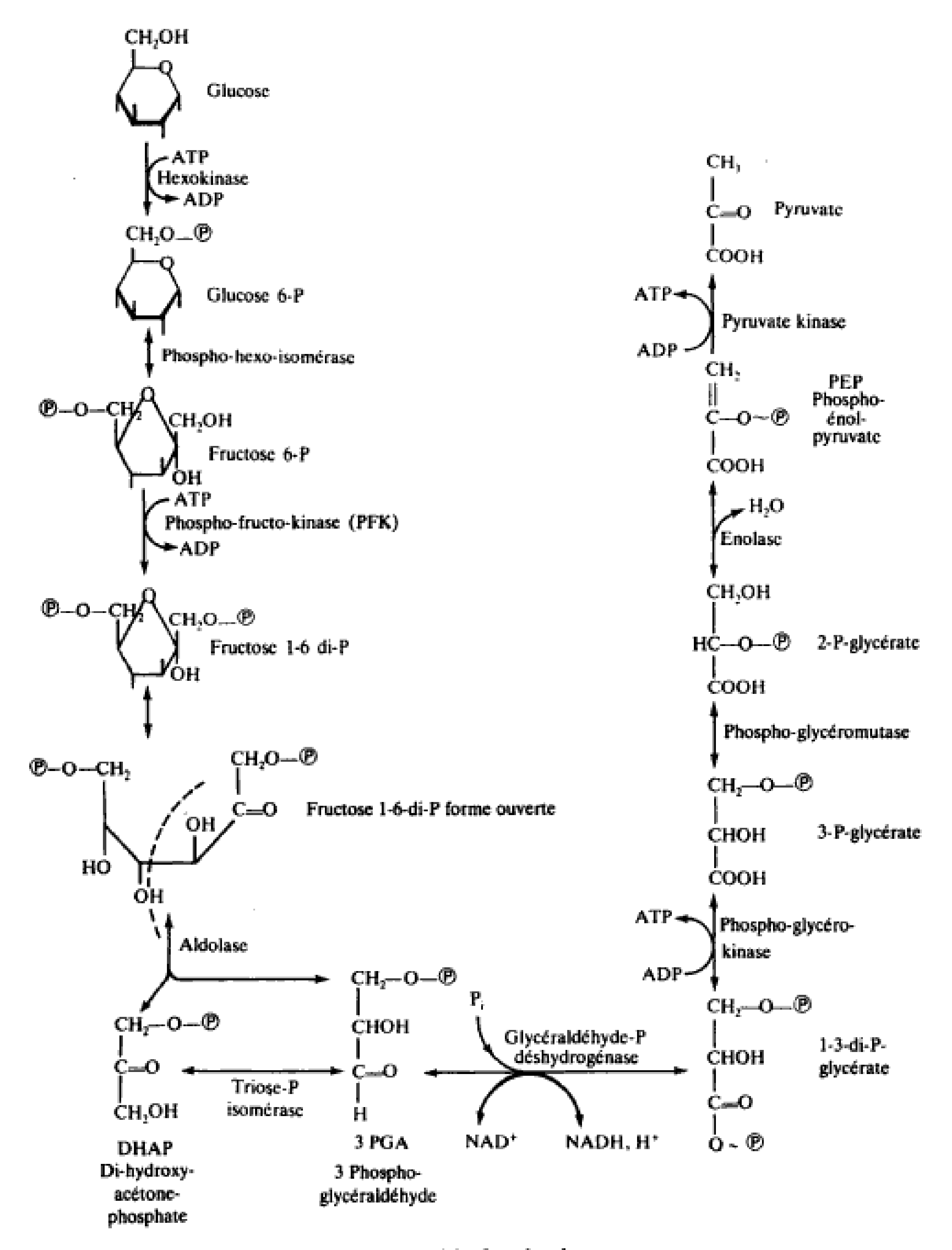


Figure 6.2 La glycolyse.

La seconde étape est un transfert du phosphate sur l'ADP sous l'action d'une 3-phosphoglycérate kinase. Le groupe transféré est le radical phosphoryle PO_3^{2-} comme pour toutes les kinases.

$$\text{1-3 diphosphoglycérate} + \text{ADP} \rightleftarrows \text{ATP} + \text{3-phosphoglycérate}$$

$$\Delta G'_0 = -18{,}8 \text{ kJ/mol} .$$

La valeur fortement négative de l'enthalpie libre standard de cette réaction explique l'évolution de la réaction précédente.

Le bilan de cette transformation s'établit donc ainsi : oxydation de la fonction aldéhyde en fonction acide couplée à la formation d'une liaison énergétique stockée par l'ATP.

- **L'isomérisation du 3-phosphoglycérate**

$$\text{3-phosphoglycérate} \rightleftarrows \text{2-phosphoglycérate} \qquad \Delta G'_0 = 4{,}4 \text{ kJ/mol} .$$

Réaction catalysée par des *phosphoglycérate-mutases*, certaines nécessitant du 2-3 diphosphoglycérate.

HO–C=O / H–C–OH / CH_2–O–Ⓟ + HO–C=O / H–C–O–Ⓟ / CH_2–O–Ⓟ (cofacteur) —Phosphoglycéromutase→ HO–C=O / H–C–O–Ⓟ / CH_2–O–Ⓟ (cofacteur régénéré) + HO–C=O / H–C–O–Ⓟ / CH_2OH

- **Formation du phosphoénolpyruvate (PEP)**

$$\text{2-phosphoglycérate} \rightleftarrows \text{phosphoénolpyruvate} + H_2O \qquad \Delta G'_0 = +1{,}6 \text{ kJ/mol} .$$

Cette réaction, catalysée par des *énolases*, est inhibée en présence de phosphates, par les fluorures qui forment un complexe E-phosphate-Mg^{2+}-fluorure. Ainsi s'explique le rôle antiglycolytique du fluorure et son utilisation.

On peut considérer qu'il s'agit d'une oxydoréduction interne (oxydation de C_2 par départ d'hydrogène et réduction de C_3 par départ de l'hydroxyle).

COOH / CH–O–Ⓟ / CH_2OH ⇄(Enolase) COOH / C–O~Ⓟ / ‖ CH_2 + H_2O

- **Formation du pyruvate**

$$\text{phosphoénolpyruvate} + \text{ADP} \rightarrow \text{pyruvate} + \text{ATP} \qquad \Delta G'_0 = -23{,}8 \text{ kJmol} .$$

Cette réaction catalysée par les *pyruvate-kinases,* qui constituent un groupe d'isoenzymes, est pratiquement irréversible compte tenu de $\Delta G'_0$. L'énergie accumu-

lée dans l'ATP résulte de la tautomérisation spontanée de l'énolpyruvate en pyruvate stable pour laquelle $\Delta G'_0$ est voisin de $-33{,}4$ kJ.mol^{-1}, ce qui est une contribution très importante.

B. Bilans moléculaire et énergétique de la glycolyse

Le bilan moléculaire final de la glycolyse est le suivant :

$$\underset{\text{glucose}}{C_6H_{12}O_6} + 2\,NAD^+ \xrightarrow[2\,ADP + 2\,P_i \;\rightarrow\; 2\,ATP + 2\,H_2O]{} \underset{\text{pyruvate}}{2\,CH_3{-}\overset{\overset{\Large O}{\|}}{C}{-}COOH} + 2\,NADH,\,H^+$$

L'oxydation d'une mole de glucose en deux moles de pyruvate s'accompagne d'un gain net de deux ATP.

La première phase de la glycolyse qui aboutit à la formation de deux trioses-phosphates consomme 2 moles d'ATP par mole de glucose.

La dernière phase qui transforme 2 moles de 1-3 diphosphoglycérate en 2 moles de pyruvate produit 2 moles d'ATP par mole d'acide pyruvique.

Le bilan énergétique est simple à établir : $2 \times 2 - 2 = 2$ ATP produits par mole de glucose transformé.

L'oxydation d'une mole de glucose en deux moles de pyruvate s'accompagne aussi de la réduction de deux moles de NAD^+ ; en aérobiose, la réoxydation dans la chaîne respiratoire mitochondriale des deux moles de NADH, H^+ produit un nombre supplémentaire d'ATP :

- 2 ATP par mole de NADH, H^+ si la navette de transport des 2[H] cytoplasmiques vers la mitochondrie est le glycérol 1 P.
- 3 ATP par mole de NADH, H^+ si la navette empruntée est le malate. A titre d'exercice, écrivons les bilans moléculaire (*) et énergétique de l'oxydation complète d'une mole de glucose en aérobiose.

		Nombre d'ATP formés
glycolyse :	$\underset{\text{glucose}}{C_6H_{12}O_6} + 2\,NAD^+ \rightarrow \underset{\text{acide pyruvique}}{2\,CH_3{-}CO{-}COOH} + 2\,NADH,\,H^+$	2
décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique	$2\,CH_3{-}CO{-}COOH + 2\,HSCoA + 2\,NAD^+ \rightarrow \underset{\text{acétyl CoA}}{2\,CH_3{-}CO \sim SCoA} + 2\,NADH,\,H^+ + 2\,CO_2$	
cycle de Krebs	$2\,CH_3{-}CO \sim SCoA + 6\,H_2O + 6\,NAD^+ + 2\,FAD \rightarrow 2\,HSCoA + 4\,CO_2 + 6\,NADH,\,H^+ + 2\,FADH_2$	2
chaîne respiratoire	$10\,NADH,\,H^+ + 5\,O_2 \rightarrow 10\,NAD^+ + 10\,H_2O$	30
	$2\,FADH_2 + O_2 \rightarrow 2\,FAD + 2\,H_2O$	4
Bilan moléculaire	$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,H_2O + 6\,CO_2$	38** ATP formés par mole de glucose

(*) Nous écrirons les bilans simplifiés en omettant volontairement de faire apparaître les équations de phosphorylation.

(**) Ce bilan énergétique est calculé en considérant que la navette utilisée est le malate, il s'établit à 36 ATP pour la navette au glycérol-1-phosphate.

Ce bilan simple est le même que celui de la combustion complète du glucose *in vitro*.

L'oxydation complète d'une mole de glucose permet à la cellule la mise en réserve de 38 ATP, soit 38 x 29 = 1 102 kJ/mol.

L'enthalpie libre standard d'oxydation du glucose, mesurée à pH 7, étant égale à – 2 876 kJ.mol^{-1}, l'efficience ou rendement est de : $\frac{1\,102 \times 100}{2\,876} \simeq 40\%$.

C. Destinées des produits de la glycolyse

1. L'ATP

Il entre dans le pool cellulaire permettant le fonctionnement des réactions endergoniques et des diverses activités cellulaires.

2. LA RÉOXYDATION DU NADH, H^+

Le NADH, H^+ doit être oxydé pour régénérer le NAD^+ nécessaire à l'évolution continue de la glycolyse, les modalités de ce processus dépendent essentiellement des conditions aérobies ou anaérobies dans lesquelles se trouve la cellule ainsi que de son équipement enzymatique.

• **Catabolisme aérobie**

En aérobiose, le NADH, H^+ est réoxydé dans la chaîne respiratoire. Dans les cellules eucaryotes la membrane mitochondriale est imperméable au NADH, H^+ ; la chaîne respiratoire étant strictement localisée dans cet organite, il est indispensable qu'un mécanisme permette le transport des atomes d'hydrogène ($H^+ + e^-$) de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie. Les deux systèmes de navette qui interviennent ont été décrits page 130.

Dans la cellule procaryote, la chaîne respiratoire étant localisée dans la membrane cytoplasmique, ces problèmes ne se posent pas.

• **Catabolisme anaérobie**

a. Transformation du pyruvate en lactate dans le muscle

Dans le muscle en état d'anaérobiose plus ou moins important, le NADH, H^+ est réoxydé par le pyruvate qui se trouve ainsi transformé en L-lactate :

$$\text{pyruvate} + \text{NADH, H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-lactate} + \text{NAD}^+ \qquad \Delta G'_0 = -25 \text{ kJ/mol}.$$

Les lactate-déshydrogénases des animaux supérieurs sont des isoenzymes tétramériques. Celles des muscles striés squelettiques régénèrent le NAD^+ en formant du lactate, celles du muscle cardiaque semblent surtout former du pyruvate à partir du lactate.

b. La fermentation alcoolique chez la levure de bière

En anaérobiose la levure de bière régénère le NAD^+ en transformant le pyruvate en éthanol au cours de deux étapes.

— Décarboxylation du pyruvate catalysée par des *pyruvate-décarboxylases* à TPP avec formation intermédiaire d'éthanal actif.

La réaction est pratiquement irréversible

$$\text{pyruvate} \xrightarrow[\text{(TPP)}]{\text{pyruvate-décarboxylase}} \text{éthanal} + CO_2 \qquad \Delta G'_0 = -19{,}6 \text{ kJ/mol} .$$

— Réduction de l'éthanal en éthanol avec régénération du NAD^+ catalysée par *l'alcool-déshydrogénase* qui renferme 4 atomes de Zn^{2+} ; un par site catalytique dans chacun des protomères

$$\text{éthanal} + \text{NADH} + H^+ \xrightleftharpoons{\text{alcool-déshydrogénase}} \text{éthanol} + NAD^+$$

$$\Delta G'_0 = -20{,}9 \text{ kJ/mol} .$$

Cette fermentation alcoolique peut être déviée. En présence d'hydrogénosulfite qui fixe l'éthanal dans une combinaison bisulfitique, le glucose est transformé en glycérol car le NADH, H^+ ne peut plus réagir avec l'éthanal :

$$\text{dihydroxyacétone-phosphate} + \text{NADH} + H^+ \rightleftarrows \text{glycérophosphate} + NAD^+ .$$

La réaction est catalysée par une *glycérophosphate déshydrogénase*. Le glycérol est ensuite libéré sous l'action d'une phosphatase. Cette transformation pourrait normalement intervenir en début de fermentation d'où la présence de glycérol comme sous-produit de la fermentation alcoolique.

c. Les fermentations bactériennes

Les bactéries aéro-anaérobies facultatives et la plupart des anaérobies strictes fermentent les sucres, elles tirent l'énergie nécessaire à leur existence de la glycolyse et réoxydent le NADH, H^+ en réduisant le pyruvate ou l'un de ses dérivés. Les modalités sont très variables selon les espèces et l'on a été amené à définir plusieurs classes de fermentations.

Les bactéries lactiques : streptocoques lactiques (lactocoques) et certains lactobacilles, utilisent la **fermentation homolactique**, l'acide lactique est le seul produit élaboré. (Certains autres lactobacilles utilisent la fermentation hétérolactique qui n'emprunte la glycolyse qu'en partie.)

Les entérobactéries utilisent la **fermentation des acides mixtes,** ce qui correspond à la production d'acide lactique, d'acide acétique, d'acide succinique, d'acide méthanoïque et d'éthanol ou bien la **fermentation butanediol,** dans ce cas, les produits élaborés sont les mêmes que ci-dessus, mais avec en plus de l'acétoïne et du 2-3-butanediol.

Les anaérobies strictes utilisent, entre autres, les voies suivantes : **fermentation**

acide butyrique, fermentation butanol-acétone, fermentation acide propanoïque (fig. 6.3).

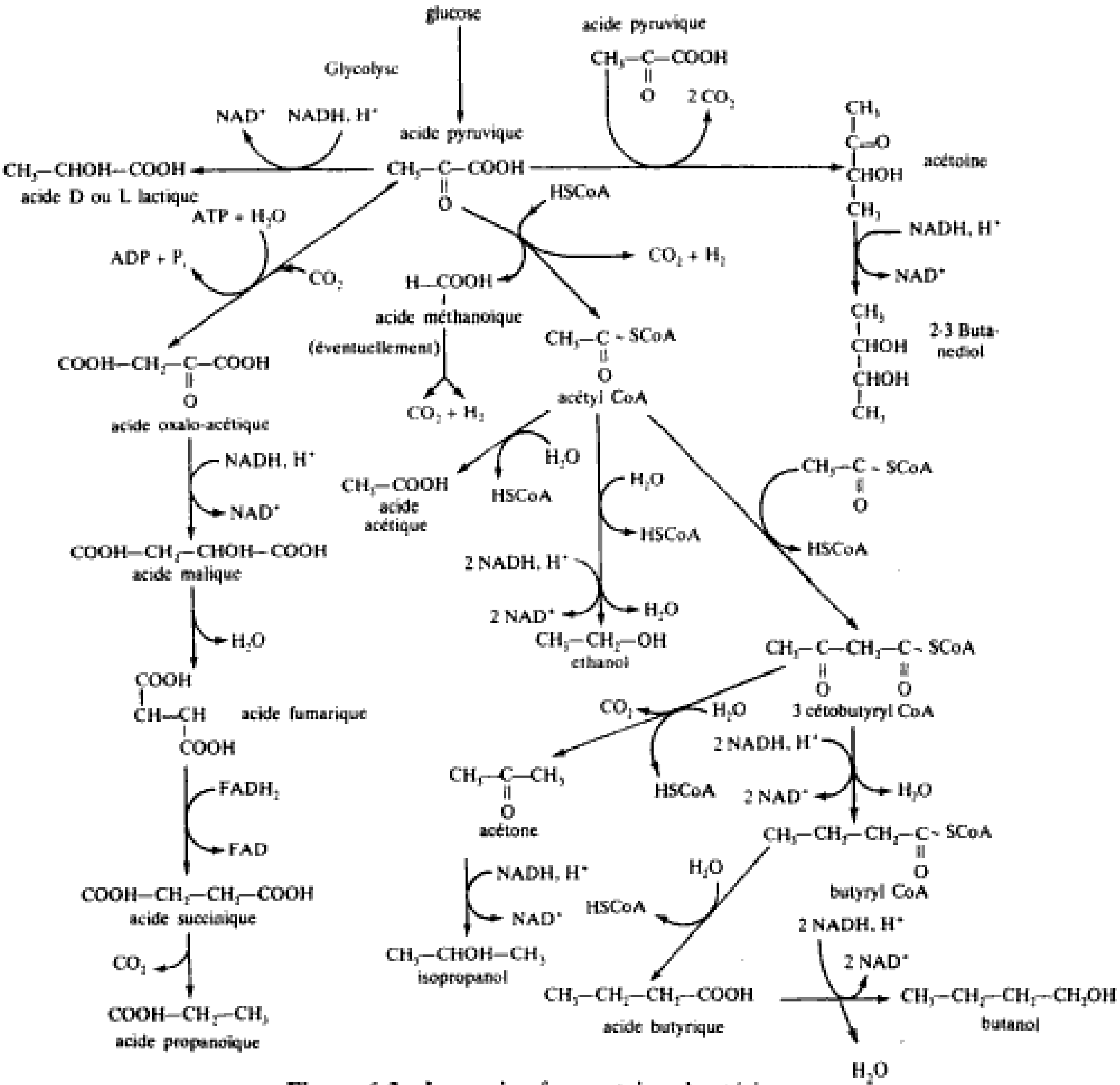


Figure 6.3 Les voies fermentaires bactériennes.

3. DESTINÉES MÉTABOLIQUES DU PYRUVATE

Le pyruvate peut être oxydé en CO_2 et H_2O en aérobiose, il contribue essentiellement, comme on vient de le voir, à la réoxydation du NADH, H^+ en anaérobiose, il sert également de préeurseur dans certaines voies de synthèse.

• **La décarboxylation oxydative du pyruvate**

Cette réaction a été décrite et étudiée page 106.

• Le cycle tricarboxylique de Krebs est alimenté par une forme active de l'acétate. *l'acétylcoenzyme A* (ou *acétyl* CoA en abrégé) : CH_3—CO ~ SCoA. La

transformation à partir du pyruvate implique une *oxydation décarboxylante* catalysée par un système multienzymatique intégré complexe : le système de la *pyruvate déshydrogénase*. Ce complexe a été obtenu à partir des cellules de cœur de porc (masse moléculaire 9.10^6 daltons) et à partir d'E. coli (masse moléculaire 4.10^6 daltons). Dans les cellules animales il est associé à la paroi mitochondriale, chez les bactéries il est lié à la membrane. Enfin, sa structure a été observée au microscope électronique.

— *Le complexe de la pyruvate déshydrogénase.*

Ce complexe macromoléculaire est une sorte de super-enzyme dans laquelle l'intégration et la disposition spatiale de ses constituants les uns par rapport aux autres augmentent l'efficacité des étapes successives de la réaction.

Sa structure est la suivante (fig. 6.4) :

— un ensemble E_1 de 24 molécules de *pyruvate-décarboxylase* (M.M. = 90.000 daltons) contenant chacune une molécule de thiamine pyrophosphate ou TPP et composées par deux chaînes peptidiques différentes et de même taille ;

— un ensemble E_2 formé par 24 sous-unités *lipoate-réductase-transacétylase* (M.M. = 40.000 daltons) contenant chacune une molécule de lipoate lié à un résidu lysyl par une liaison amide ;

— un ensemble E_3 constitué par 24 molécules de *dihydrolipoate-réductase* (M.M. = 55.000 daltons) chacune contenant deux molécules de FAD lié.

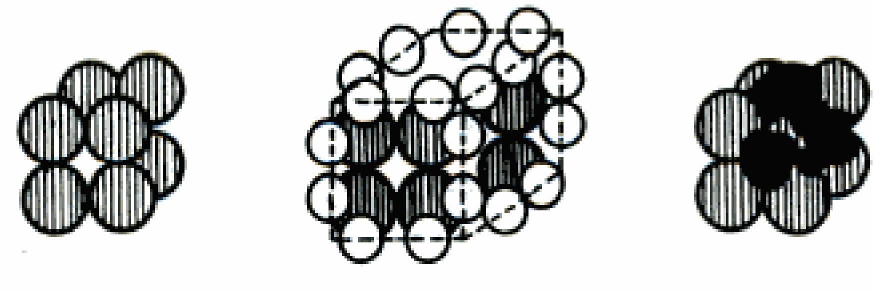


Figure 6.4 Structure du complexe de la pyruvate déshydrogénase.
(Le cube E_2 forme la charpente et l'organisateur du complexe.)

Les coenzymes impliqués dans cette réaction complexe sont :

— deux coenzymes transporteurs non liés dans le complexe : le NAD^+ et le coenzyme *A* ;

— des coenzymes liés aux apoenzymes et participant à la structure du complexe : le FAD, le lipoate, la thiamine pyrophosphate (TPP) ;

— *Les étapes de la réaction.*

• décarboxylation avec formation d'éthanal actif

$$CH_3\text{—}CO\text{—}COOH + E_1\text{—}TPP \rightleftarrows E_1\text{—}TPP\text{—}CHOH\text{—}CH_3 + CO_2$$

• oxydation de l'éthanal actif en thioester en présence de lipoate ;

$$E_1\text{—}TPP\text{—}CHOH\text{—}CH_3 + E_2\text{—}lipoyl\left\langle\begin{matrix} S \\ | \\ S \end{matrix}\right. \rightleftarrows E_2\text{—}lipoyl\left\langle\begin{matrix} S\sim CO\text{—}CH_3 \\ \\ SH \end{matrix}\right. + E_1\text{—}TPP$$

Réaction de synthèse de l'acide oxaloacétique

$$\underset{\text{Pyruvate}}{\begin{matrix}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_3\end{matrix}} + CO_2 \xrightarrow[\text{ATP + } H_2O \;\; \text{ADP + } P_i]{\text{Pyruvate carboxylase (Biotine)}} \underset{\text{Oxaloacétate}}{\begin{matrix}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_2\\|\\COOH\end{matrix}}$$

Réaction de synthèse de l'acide malique

$$\underset{\text{Pyruvate}}{\begin{matrix}COOH\\|\\C{=}O\\|\\CH_3\end{matrix}} + CO_2 \xrightarrow[\text{NADPH, } H^+ \;\; NADP^+]{\text{Enzyme malique}} \underset{\text{Malate}}{\begin{matrix}COOH\\|\\CHOH\\|\\CH_2\\|\\COOH\end{matrix}}$$

Le pyruvate sert également de précurseur dans la synthèse des acides gras par l'intermédiaire de l'acétyl coenzyme *A*.

D. Entrée dans la glycolyse d'autres oses et de diholosides

Quelques oses sont également susceptibles d'être dégradés dans la glycolyse, il s'agit du galactose, du fructose et du mannose. Certains de ces oses existent à l'état de sucres simples dans les aliments, d'autres proviennent de l'hydrolyse de diholosides. Ces derniers doivent nécessairement subir la réaction d'hydrolyse, libérant deux oses, pour être dégradés ; le saccharose est transformé par une invertase :

$$\text{saccharose} + H_2O \xrightarrow{\text{invertase}} \text{glucose} + \text{fructose}$$

le lactose par une β-galactosidase :

$$\text{lactose} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{ galactosidase}} \text{galactose} + \text{glucose}$$

le maltose par une maltase (α-glucosidase) :

$$\text{maltose} + H_2O \xrightarrow{\text{maltase}} 2\text{ glucose}$$

1. ENTRÉE DU FRUCTOSE DANS LA GLYCOLYSE

Il existe deux voies d'entrée possibles du fructose dans la glycolyse :

— la première est la phosphorylation du fructose en fructose 6-phosphate par l'hexokinase

$$\text{Fructose} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{2+}]{HK} \text{Fructose 6-P} + \text{ADP} .$$

Cette voie est généralement peu active, l'enzyme a une faible affinité pour le fructose ;

— la seconde est la phosphorylation du fructose en fructose-1-phosphate par une fructokinase, enzyme hépatique.

$$\text{fructose} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{fructokinase}} \text{fructose 1-P} + \text{ADP}$$

Le fructose 1-phosphate est clivé en deux trioses par une phosphofructoaldolase :

$$\text{fructose 1-P} \xrightarrow{\text{phosphofructoaldolase}} \text{glycéraldéhyde} + \text{dihydroxy-acétone-phosphate}$$

Le dihydroxyacétone phosphate suit la voie de dégradation de la glycolyse.

Le glycéraldéhyde est phosphorylé par la triose-kinase en 3 phosphoglycéraldéhyde et rejoint ainsi la glycolyse :

$$\text{glycéraldéhyde} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{triose-kinase}} \text{3-phosphoglycéraldéhyde} + \text{ADP}$$

2. ENTRÉE DU GALACTOSE DANS LA GLYCOLYSE

Les modalités de l'entrée du galactose dans la glycolyse sont différentes de celles du fructose : le galactose est épimérisé en glucose grâce à une série de réactions.

Dans un premier temps, le galactose est phosphorylé en galactose-1-phosphate par une galactokinase :

$$\text{galactose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{galactokinase}} \text{galactose 1-P} + \text{ADP}$$

La deuxième étape est une réaction de transfert de résidus osidyl-1-P entre l'UDP-glucose (Uridyl-di-phosphate-glucose) et le galactose 1-P, réaction catalysée par la galactose 1-phosphate-uridyl-transférase.

$$\text{galactose 1-P} + \text{UDP-glucose} \xrightleftharpoons{\text{galactose 1-phosphate uridyl transférase}} \text{UDP-galactose} + \text{glucose 1-P}$$

Certaines personnes souffrent d'une carence en cette enzyme, appelée galactosémie congénitale, qui induit un blocage du catabolisme du galactose, générateur de troubles graves.

L'UDP galactose est épimérisé en UDP-glucose par une UDP-galactose-4-épimérase :

$$\text{UDP-galactose} \xrightleftharpoons{\text{épimérase}} \text{UDP-glucose}$$

L'UDP glucose libère un glucose-1-P dans la réaction catalysée par la transférase.

Le glucose-1-P est converti en glucose-6-P par la phosphoglucomutase :

$$\text{glucose 1-P} \xrightleftharpoons{\text{phosphoglucomutase}} \text{glucose 6-P}$$

3. ENTRÉE DU MANNOSE DANS LA GLYCOLYSE

Le catabolisme du mannose commence par une phosphorylation de cet ose en mannose 6-phosphate, réaction catalysée par l'hexokinase :

$$\text{mannose + ATP} \xrightarrow[\text{Mg}^{2+}]{\text{HK}} \text{mannose-6-P + ADP}$$

Puis, le mannose 6-phosphate est converti en fructose-6-phosphate par une mannose 6-phosphate isomérase :

$$\text{mannose-6-phosphate} \xrightarrow{\text{mannose-6-P isomérase}} \text{fructose-6-phosphate}$$

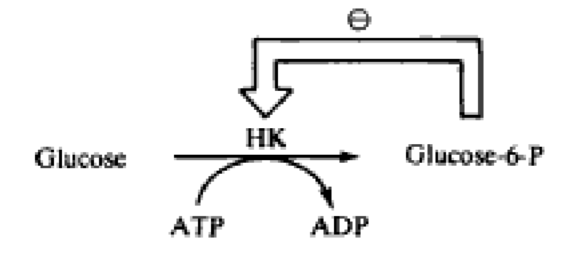
E. Régulation de la glycolyse

La consommation de glucose dans une cellule est adaptée à ses besoins, il existe différents mécanismes de modulation de la voie glycolytique.

Le premier d'entre eux s'appelle **la régulation fondamentale**, il est fondé sur des déplacements d'équilibre, donc sur des mécanismes physico-chimiques : un excès de glucose active la glycolyse, un excès de pyruvate la modère.

Le mécanisme le plus efficace est la **régulation enzymatique**, certaines enzymes — appelées enzymes-clés — contrôlent les étapes limitantes de cette voie, et par conséquent la vitesse de consommation du glucose.

L'**hexokinase** représente la première des enzymes clés, elle est inhibée allostériquement par le produit de la réaction qu'elle catalyse, le glucose-6-P.



La **phosphofructokinase** est le point de contrôle essentiel de la glycolyse, cette enzyme allostérique est inhibée par l'ATP.

⊖ ATP

Fructose-6-P —PFK→ Fructose 1-6 di-P + ADP

ATP ADP

L'enzyme possède deux sites de fixation pour l'ATP, un site *substrat* : l'enzyme présente une spécificité large pour les purines nucléotides triphosphates, ATP, GTP, ITP et un site *allostérique inhibiteur,* à cet égard, la spécificité est étroite vis-à-vis de l'ATP (fig. 6.5).

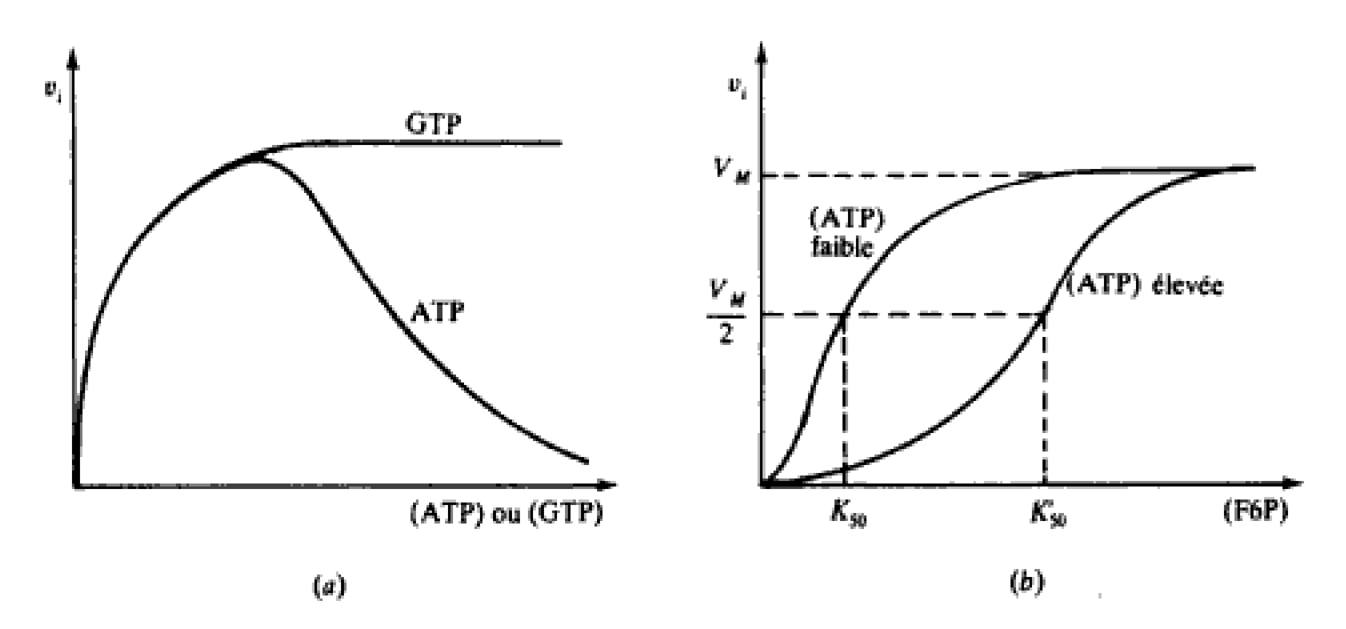


Figure 6.5 Courbes représentatives de l'équation de vitesse de la PFK.
a) Pour une concentration de F6P fixe et des concentrations d'ATP ou de GTP variables : le GTP est substrat de l'enzyme mais non inhibiteur.
b) Pour deux concentrations fixes d'ATP et des concentrations variables de F6P : l'ATP augmente la K_{50}, et par conséquent diminue l'affinité de l'enzyme pour le F6P.

Le contrôle de la glycolyse par la PFK est relativement complexe, il existe pour cette enzyme d'autres modulateurs allostériques et des interactions entre eux. Le *citrate* est inhibiteur et l'AMP activateur, une teneur importante de citrate cytoplasmique devient inhibitrice en présence d'ATP, en revanche l'AMP lève l'inhibition par l'ATP et par le citrate.

La modulation de l'activité de la PFK, enzyme-clé de la glycolyse, explique, en partie, le contrôle qu'exerce la respiration sur la glycolyse.

L'ATP, produit par phosphorylation oxydative dans la mitochondrie, agit à deux niveaux :

— exporté dans le cytoplasme, il inhibe la PFK,

— dans la matrice mitochondriale il inhibe l'isocitrate déshydrogénase, le citrate s'accumule et est exporté dans le cytoplasme où il inhibe la PFK.

La **pyruvate kinase** contribue également à la régulation de la glycolyse, elle est inhibée par l'ATP.

L'**effet Pasteur** peut se définir comme le contrôle des fermentations par l'oxygène chez les organismes aérobies-anaérobies facultatifs.

En présence d'O_2, les fermentations ne se manifestent pas, les organismes respirent.

Quel rôle joue l'oxygène ? Son action est indirecte, cette molécule n'inhibe ni la synthèse ni l'activité des enzymes des voies fermentaires.

• **La carboxylation du pyruvate en malate**

Cette première phase localisée dans la mitochondrie débute par la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate :

Acétyl CoA ⊗

$$CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}COOH + CO_2 \xrightarrow[\text{ATP + } H_2O \;\to\; \text{ADP + } P_i]{\text{Pyruvate carboxylase (biotine)}} COOH{-}CH_2{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}COOH$$

Pyruvate → Oxaloacétate

La pyruvate carboxylase possède un coenzyme fortement lié à l'enzyme : la biotine ; elle est activée par l'acétyl-CoA ; en absence d'acétyl CoA l'enzyme est inactive.

L'oxaloacétate est réduit en malate, réaction catalysée par la malate déshydrogénase mitochondriale.

$$COOH{-}CH_2{-}CO{-}COOH \xrightarrow[\text{NADH, } H^+ \;\to\; NAD^+]{\text{MDH}} COOH{-}CH_2{-}CHOH{-}COOH$$

Oxaloacétate → Malate

• **Le transport du malate vers le cytoplasme**

Cette molécule va servir de navette (rôle déjà évoqué p. 131) et être transportée dans le cytoplasme grâce à un système enzymatique localisé dans la membrane interne mitochondriale.

• **La synthèse du phosphoénol pyruvate (PEP)**

Dans le cytoplasme le malate est réoxydé en oxaloécétate, qui est ensuite converti en PEP

$$\text{Malate} + NAD^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Oxaloacétate} + \text{NADH, } H^+$$

$$COOH{-}CH_2{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}COOH \xrightarrow[\text{GTP} \;\to\; \text{GDP}]{\text{PEP carboxykinase}} \begin{matrix} COOH \\ | \\ C{-}O{\sim}Ⓟ \\ \| \\ CH_2 \end{matrix} + CO_2$$

Oxaloacétate → PEP

(GDP + ATP → GTP + ADP)

Le bilan moléculaire de cette étape de transformation du pyruvate en PEP peut s'écrire :

$$\text{Pyruvate} \xrightarrow[2\,ATP + H_2O \;\; 2\,ADP + P_i]{} \text{PEP}$$

2. LA FORMATION DU FRUCTOSE-6-PHOSPHATE À PARTIR DU FRUCTOSE 1-6 DIPHOSPHATE

Une hydrolase, appelée fructose 1-6 diphosphate phosphatase, catalyse la réaction :

$$\text{Fructose 1-6 di-phosphate} + H_2O \xrightarrow{\text{Fructose 1-6 di phosphate phosphatase}} \text{Fructose 6-P} + P_i$$

3. LA FORMATION DU GLUCOSE À PARTIR DU GLUCOSE 6-P

Cette conversion est catalysée par une enzyme hépatique, la glucose 6-P-phosphatase qui est une hydrolase.

$$\text{Glucose-6-P} + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose 6-P-phosphatase}} \text{Glucose} + P_i$$

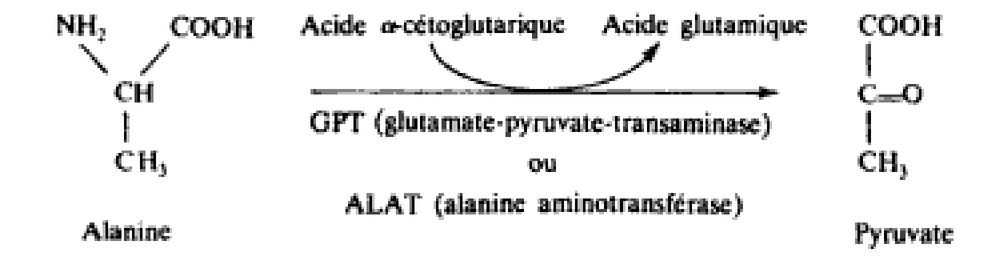
B. Les entrées dans la néoglucogenèse

1. LES ACIDES AMINÉS GLUCOFORMATEURS

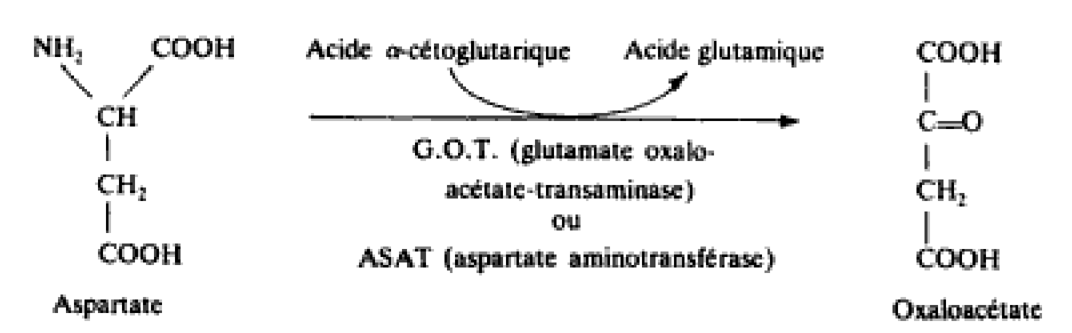
Les acides aminés glucoformateurs libèrent par désamination ou transamination : du pyruvate, de l'oxaloacétate, du malate ou une molécule aisément transformable en l'une des trois molécules précitées.

Exemples :

- l'alaline



- l'acide aspartique



$$\text{glycérol} \xrightarrow[\text{ATP} \quad \text{ADP}]{\text{glycérol kinase}} \text{glycérol-}Ⓟ \xrightarrow[\text{NAD}^+ \quad \text{NADH, H}^+]{\text{glycérol-P-DH}} \text{dihydroxy-acétone-P}$$

C. Bilan énergétique

La synthèse d'une molécule de glucose à partir de deux molécules de pyruvate consomme six molécules d'ATP.

Le passage du pyruvate au PEP consomme deux molécules d'ATP par molécule de pyruvate.

Le passage du 3-P-glycérate au 1-3 di-P-glycérate nécessite une molécule d'ATP.

Le bilan s'établit à 3 ATP par molécule de pyruvate, soit 6 ATP par molécule de glucose.

D. Régulation de la néoglucogenèse

La régulation basale fondée sur les déplacements d'équilibres chimiques contribue à activer la néoglucogenèse si la teneur en glucose sanguin vient à baisser, mais les mécanismes les plus actifs sont enzymatiques.

La pyruvate carboxylase est activée par l'acétyl coenzyme *A* et inhibée par l'ADP ; la fructose 1-6 diphosphate phosphatase est inhibée par l'AMP.

Glycolyse et néoglucogenèse ont un fonctionnement antagoniste, les modulateurs activent l'une des voies en inhibant l'autre, de façon à adapter le métabolisme cellulaire aux situations physiologiques ou pathologiques de l'organisme.

III. LE MÉTABOLISME DU GLYCOGÈNE

Le glycogène représente la forme de réserve glucidique chez les animaux, les champignons et certaines bactéries. Chez les animaux supérieurs le glycogène est stocké dans le foie et les muscles squelettiques.

A. La glycogénolyse

La dégradation du glycogène résulte d'une phosphorolyse catalysée par une glycogène phosphorylase, en présence de phosphate minéral.

$$\text{glycogène}_{(n)} + H_3PO_4 \xrightarrow[\text{phosphorylase}]{\text{glycogène}} \text{glycogène}_{(n-1)} + \text{glucose-1-P}$$

L'enzyme qui catalyse la phosphorylation de la phosphorylase kinase inactive et la transforme en phosphorylase kinase active s'appelle la protéine kinase (ou phosphorylase kinase kinase).

Cette enzyme existe à l'état dimérique inactif, elle est constituée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Dans le complexe dimérique la sous-unité régulatrice masque l'activité de la sous-unité catalytique.

L'activation est provoquée par l'AMP-3',5'-cyclique (AMPc) qui en se liant à la sous-unité régulatrice, dissocie les sous-unités de l'enzyme inactive, libérant la sous-unité catalytique.

AMP-3',5'-cyclique (AMP_c)

NH_2 N N N N O—CH_2 O O=P—O OH

protéine kinase inactive

sous-unité régulatrice — sous-unité catalytique

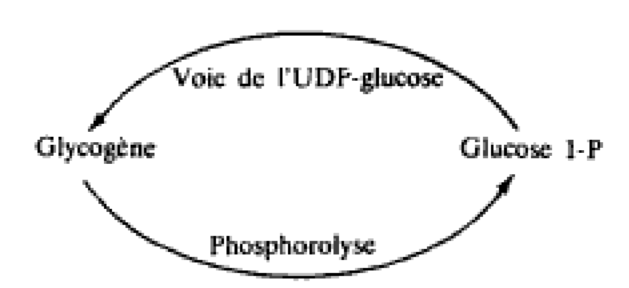
AMP_c

[sous-unité régulatrice-AMP_c] — sous-unité catalytique active

L'AMPc est un signal, le second médiateur selon Sutherland, synthétisé par une enzyme située dans la membrane cytoplasmique (l'adényl cyclase) dont le fonctionnement est déclenché par les hormones hyperglycémiantes (adrénaline et glucagon) :

$$\text{ATP} \xrightarrow[\text{cyclase}]{\text{Adényl}} \text{Ⓟ—O—Ⓟ} + \text{AMPc} .$$

La figure 6.8 montre comment l'hormone déclenche un processus, dont l'AMPc est le médiateur, et qui est constitué de réactions enzymatiques en série destinées à amplifier le signal, qui aboutit à la phosphorolyse du glycogène.



B. La glycogénogenèse

Les voies de synthèse et de dégradation du glycogène sont séparées ; la synthèse du glycogène n'emprunte pas la voie inverse de la glycogénolyse, elle s'effectue par la voie de l'uridine-diphosphate glucose (UDP-glucose).

Protéine réceptrice d'hormone
Hormone { Glucagon (foie) / Adrénaline (muscle)
Transition d'activation
Membrane cytoplasmique
Adényl cyclase
ATP
AMP_c
Ⓟ–O–Ⓟ
Protéine kinase
Sous-unité régulatrice – Sous-unité catalytique
AMP_c-Sous-unité régulatrice
Protéine kinase active
ADP
ATP
Phosphorylase kinase inactive
Phosphorylase kinase active
ATP
ADP
Phosphorylase *b* → Phosphorylase *a*

$$\underset{(n)}{\text{Glycogène}} + P_i \rightarrow \underset{(n-1)}{\text{Glycogène}} + \text{G1P}$$

Figure 6.8 Séquence des réactions du contrôle hormonal de la glycogénolyse.

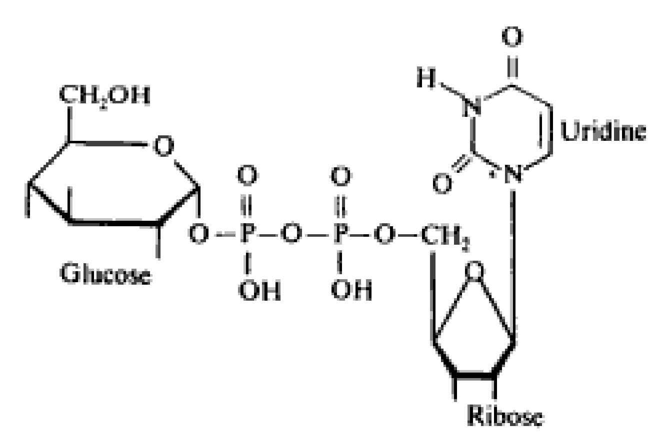
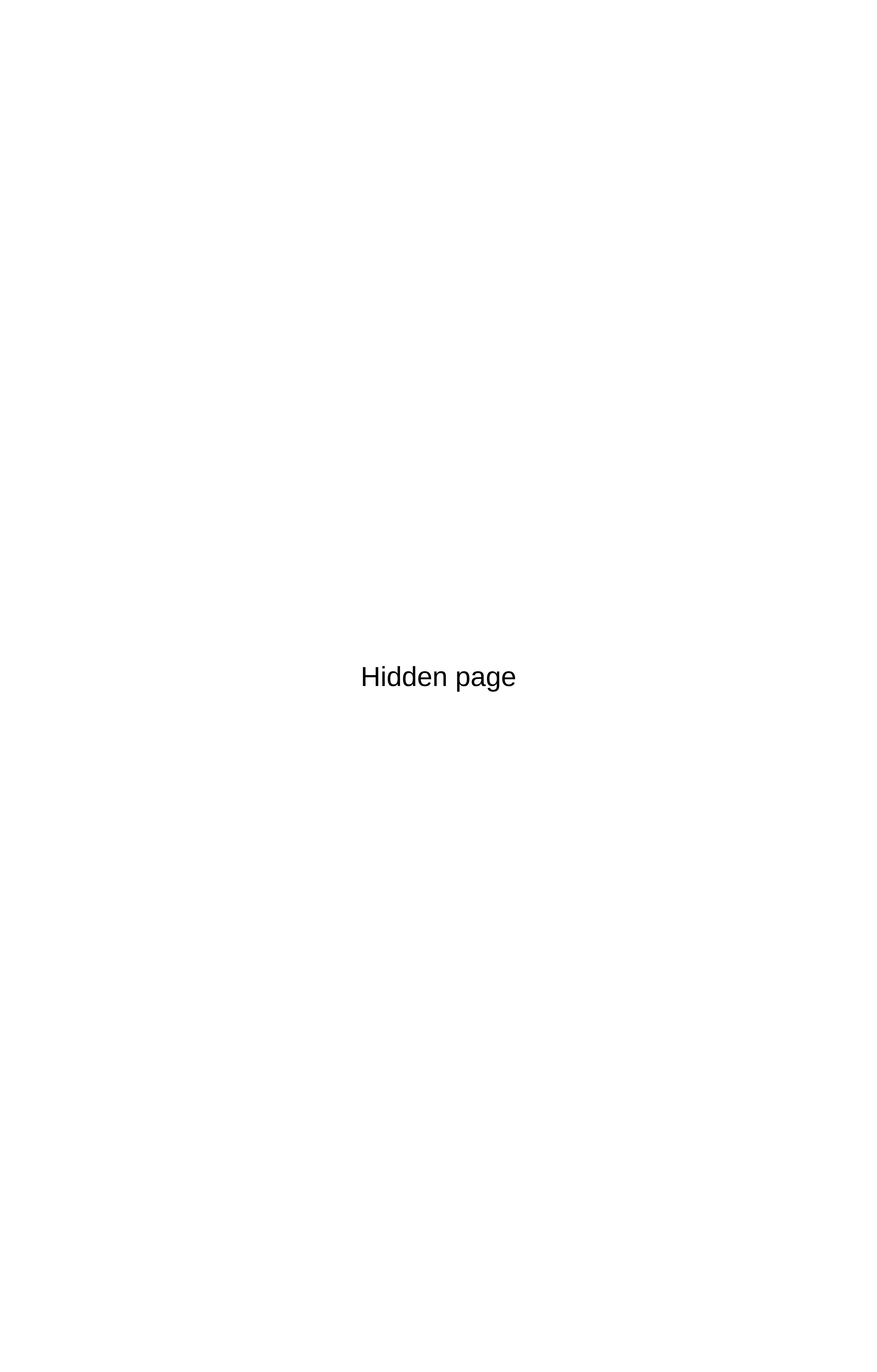


Figure 6.9 Structure de l'UDP-glucose.


Hidden page

élevée, c'est la forme *D* (Dépendante) ; l'autre est déphosphorylée, appelée *I* (Indépendante), active en absence de glucose-6-P.

La protéine kinase (p. 171) catalyse la phosphorylation de la glycogène synthétase *I* en forme *D*.

Une glycogène synthétase phosphatase catalyse la transformation inverse.

Ceci démontre que lorsque la glycogène phosphorylase est activée, la glycogène synthétase est désactivée et réciproquement.

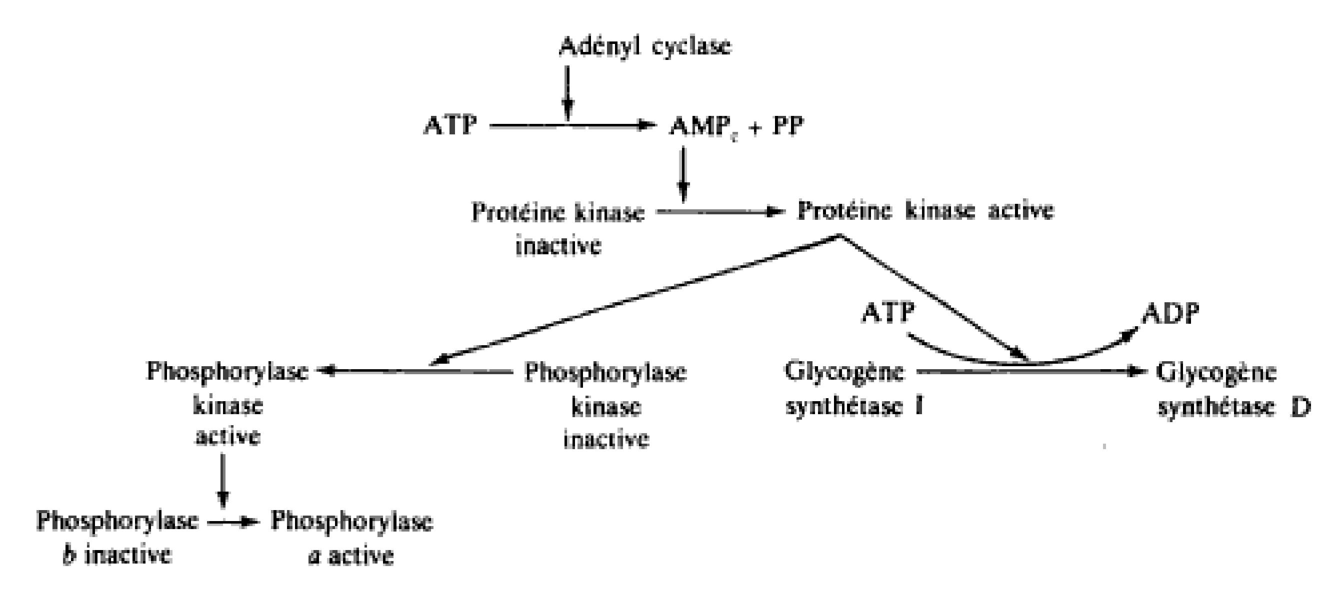
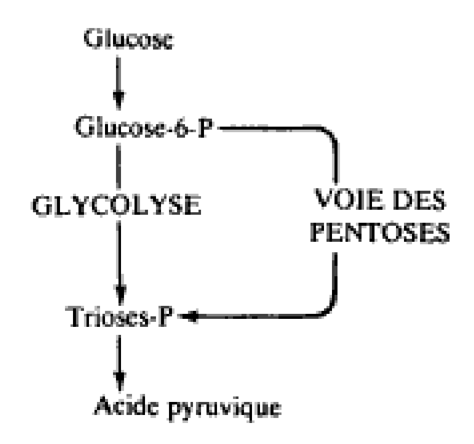


Figure 6.11 Régulation des voies de synthèse et de dégradation du glycogène.

IV. LA VOIE DES PENTOSES

La voie des pentoses, appelée aussi voie des hexoses monophosphates, existe chez tous les organismes animaux et végétaux et chez la quasi-totalité des bactéries.

On peut la considérer comme une voie d'oxydation du glucose branchée en parallèle sur la glycolyse :



Comme dans cette voie, il y a mise en jeu d'oses phosphorylés et les enzymes sont en solution dans le cytoplasme.

Si l'on se pose la question de la signification physiologique de la voie des pentoses, voie d'oxydation destinée à produire de l'énergie sous forme d'ATP ou voie servant à pourvoir la cellule en métabolites précurseurs de synthèse, il convient d'observer que ce type de métabolisme est plus intense dans les tissus où règne une forte activité de synthèse : glande mammaire, tissu adipeux en phase d'élaboration.

La voie des pentoses produit des équivalents réducteurs, sous forme de NADPH, H^+ nécessaires à la synthèse des acides gras et aux réactions d'hydroxylation, des pentoses, et de l'érythrose-P, précurseur de certains acides aminés.

A. Les étapes de la voie des pentoses

La voie des pentoses comporte deux séries de réactions, une première séquence est constituée des réactions d'oxydation, la deuxième est une suite de réactions d'isomérisations et de transferts intermoléculaires de groupements d'atomes mettant en jeu des molécules en C_3, C_4, C_5, C_6 et C_7.

1. LES RÉACTIONS D'OXYDATION

- **L'oxydation du glucose 6-phosphate**

Cette réaction catalysée par la glucose 6-P déshydrogénase, enzyme à $NADP^+$, libère la 6 phosphogluconolactone, ester interne entre le —COOH en C_1 et le —OH en C_5 de la molécule.

CH_2O—Ⓟ
O
G-6-PDH
$NADP^+$
NADPH, H^+
CH_2O—Ⓟ
O
=O
Glucose 6-P
6-P-gluconolactose

L'hydrolyse du produit de cette réaction se fait spontanément ($\Delta G'_0 = -21$ kJ/mol), mais aussi enzymatiquement catalysée par une lactonase.

CH_2O—Ⓟ
O
=O
Lactonase
H_2O
COOH
CH_2—O—Ⓟ
Acide 6-P gluconique

• **La décarboxylation oxydative de l'acide 6-P gluconique**

La deuxième oxydation de cette voie est la décarboxylation oxydative d'un β-hydroxyacide.

L'enzyme est une déshydrogénase à $NADP^+$: la 6-P-gluconate déshydrogénase.

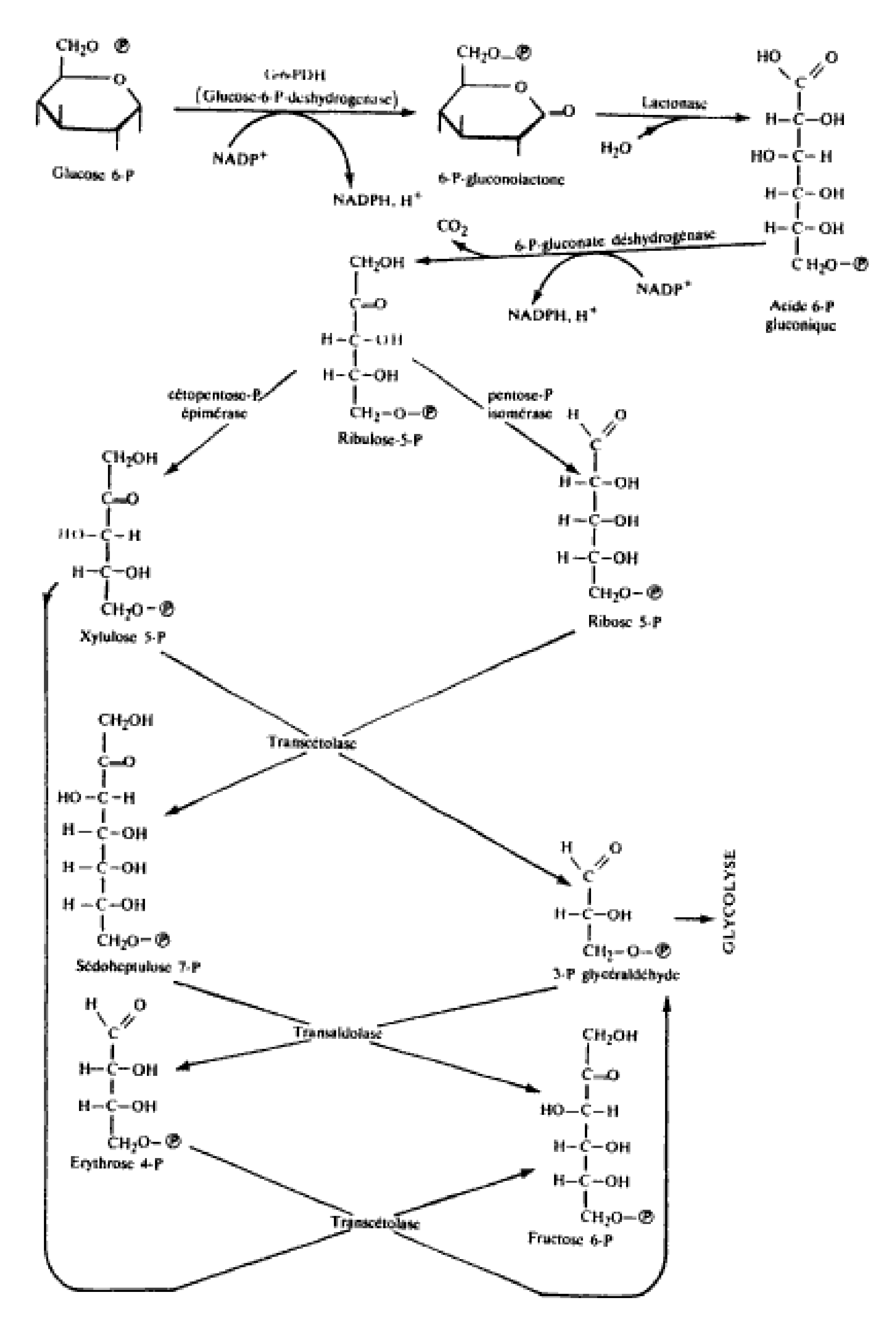


Figure 6.12 Vue d'ensemble de la voie des pentoses.

transfert d'un chaînon dicarboné, prélevé à un cétose phosphate (le xylulose 5-P), sur un aldose phosphate (le ribose 5-P).

Xylulose 5-P + Ribose 5-P ⇌ (Transcétolase) Glycéraldéhyde 3-P + Sedoheptulose 7-P

• **Remaniement dû à la transaldolase**

Cette enzyme, à laquelle on ne connaît pas de coenzyme, va transférer un chaînon tricarboné prélevé au sedoheptulose 7-P, sur le 3-P glycéraldéhyde.

Sedoheptulose 7-P + Glycéraldéhyde 3-P ⇌ (transaldolase) Erythrose 4-P + Fructose 6-P

• **Deuxième intervention de la transcétolase**

La transcétolase va transférer un chaînon dicarboné provenant du xylulose 5-P sur l'érythrose 4-P

Xylulose 5-P + Erythrose 4-P ⇌ (transcétolase) Glycéraldéhyde 3-P + Fructose 6-P

• **Interconversion glucose 6-P fructose 6-P**

Ces deux oses phosphates sont interconvertibles grâce à la phospho-hexo-isomérase :

Glucose 6-P ⇌ (Phospho-hexo-isomérase) Fructose 6-P

B. Le bilan du cycle des pentoses

Ce bilan, tout à fait théorique, est établi sans tenir compte du prélèvement de métabolites carbonés destinés aux synthèses.

3 glucose 6-P +6 $NADP^+$	+ 3 H_2O	→ 3 ribulose-5-P + 3 CO_2 + 6 NADPH, H^+
2 ribulose 5-P		→ 2 xylulose 5-P
ribulose 5-P		→ ribose 5-P
2 xylulose 5-P + ribose 5-P		→ 2 fructose 6-P + glycéraldéhyde 3-P
2 fructose 6-P		→ 2 glucose 6-P
Glucose 6-P + 6 $NADP^+$, H^+	+ 3 H_2O	→ 3 CO_2 + 6 NADPH, H^+ + glycéraldéhyde 3-P

C. Rôles de la voie des pentoses

1. CONTRIBUTION DE LA VOIE DES PENTOSES AU MÉTABOLISME OXYDATIF DU GLUCOSE

En aérobiose, la réoxydation des coenzymes réduits est génératrice d'énergie, dont une partie est récupérée sous forme d'ATP, mais peut-on envisager un rôle énergétique de la voie des pentoses quand on sait que le NADP, H^+ ne pénétre pas dans la mitochondrie, et qu'il n'est pas directement réoxydable par les systèmes transporteurs d'électrons membranaires ?

Un certain nombre de mécanismes permettent cette réoxydation ; chez les animaux supérieurs l'enzyme malique contribue à cette réaction.

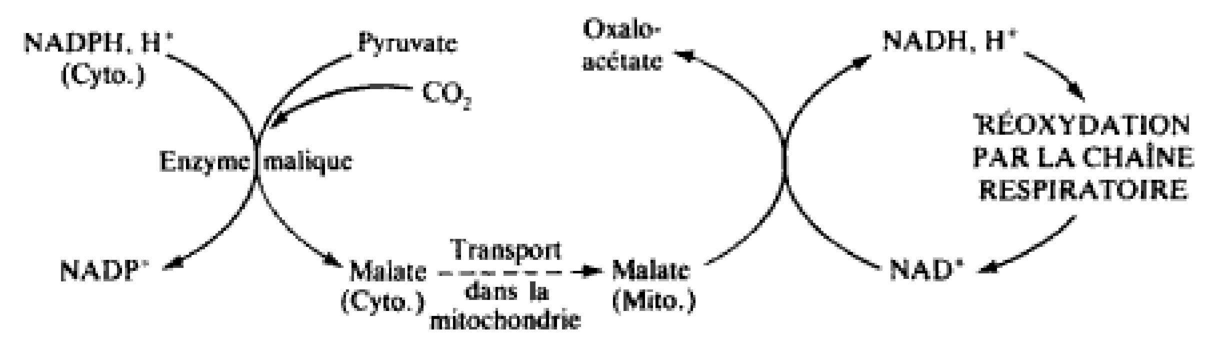


Figure 6.13 Mécanisme de réoxydation du NADPH, H^+ dans les mitochondries des cellules animales.

Il est difficile de mesurer avec précision la part qui revient à la voie des pentoses et à la glycolyse dans le catabolisme du glucose, mais il est vraisemblable que c'est la glycolyse qui assure de façon prépondérante cette fonction ; la voie des pentoses apparaissant comme une voie de synthèse de métabolites précurseurs.

En anaérobiose, les premières réactions de la voie des pentoses sont utilisées par les lactobacilles hétérofermentaires.

2. RÔLE DANS LES VOIES DE BIOSYNTHÈSE

- **Production de molécules de NADPH, H^+, équivalents-réducteurs**

Le NADPH, H^+ est le coenzyme transporteur d'hydrogène d'enzymes catalysant des réductions au cours de réactions de syntèse : acides gras, cholestérol, réactions d'hydroxylation.

- **Le ribose 5-P** sert à la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques.

- **L'érythrose 4-P** est le précurseur d'acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine, tryptophane et histidine.

7

Le métabolisme des lipides

L'étude du métabolisme des lipides sera limitée aux acides gras, aux glycérolipides et aux stéroïdes.

I. LE CATABOLISME DES ACIDES GRAS

Quantitativement, la fraction la plus importante du métabolisme des lipides intéresse les lipides de réserve : les triglycérides ou triacylglycérols. Sous l'influence des lipases, abondantes dans les tissus adipeux et les graines oléagineuses, les triglycérides sont hydrolysés en leurs constituants, le glycérol et les acides gras.

— Le glycérol, phosphorylé par l'ATP en présence d'une glycérolkinase peut être réutilisé pour des synthèses lipidiques ou rejoindre le métabolisme glucidique.

— Le catabolisme des acides gras se réalise selon un mode particulier dont l'hypothèse fut émise par Knoop à la suite d'expériences de marquage d'acides gras par un radical phényle. L'utilisation des éléments marqués et les travaux de Lynen permirent d'élucider complètement ce mécanisme dit de la β-oxydation.

La β-oxydation, qui représente la voie essentielle du catabolisme des acides gras, est une oxydation qui a pour conséquence la scission de la molécule de deux en deux atomes de carbone en partant du carboxyle :

$$CH_3 \cdots\cdots \vdots\; \underbrace{CH_2 — CH_2}_{2\,C} \;\vdots\; \underbrace{CH_2 — \overset{\beta}{CH_2}}_{2\,C} \;\vdots\; \underbrace{\overset{\alpha}{CH_2} — COOH}_{2\,C}$$

Les acides gras sont catabolisés dans les mitochondries, le transport à partir du cytoplasme s'effectue sous forme combinée, par exemple d'ester de carnitine.

A. L'activation des acides gras

Les acides gras sont libérés par lipolyse intracellulaire dans le cytoplasme ; leur catabolisme a lieu dans les mitochondries et porte sur les formes métaboliques actives

La carnitine

Le transfert requiert deux réactions de transacylations localisées sur les faces externe et interne de la membrane interne de la mitochondrie, réactions catalysées par l'acyl carnitine transférase.

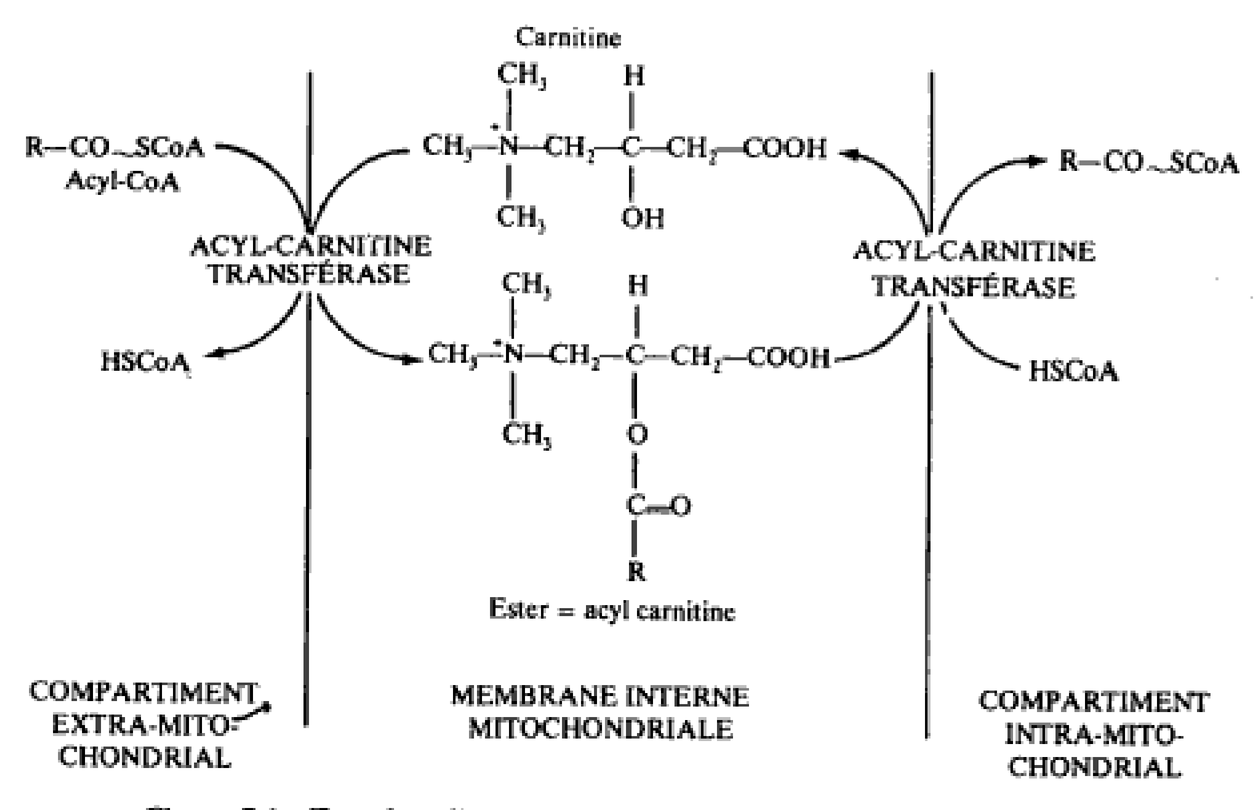


Figure 7.1 Transfert d'un acyl CoA sous forme d'ester de la carnitine.

B. La *β*-oxydation

L'enlèvement d'un chaînon dicarboné à partir de l'extrémité carboxylique de l'acyl CoA est réalisé en quatre étapes :

• **Déshydrogénation des carbones *α* et *β*,** catalysée par une acyl-coenzyme *A*-déshydrogénase, flavoprotéine à FAD (FP_3, p. 118).

$$R-CH_2-CH_2-CH_2-CO\sim SCoA \xrightarrow[\text{E-FAD} \quad \text{E-FADH}_2]{} R-CH_2-CH{=}CH-CO\sim SCoA$$

Acyl-CoA → Déhydroacyl,ène 2-3, CoA

• **Addition d'une molécule d'eau** sous l'influence d'une éthylène-hydratase ou crotonase :

$$R-CH_2-CH{=}CH-CO\sim SCoA + H_2O \longrightarrow R-CH_2-CHOH-CH_2-CO\sim SCoA$$

L-3 hydroxyacyl-coenzyme A

• **Nouvelle déshydrogénation** par une enzyme spécifique des formes L dont le coenzyme est le NAD^+, la 3-hydroxyacyl-coenzyme *A*-déshydrogénase :

$$R{-}CH_2{-}CHOH{-}CH_2{-}CO{\sim}SCoA \xrightarrow[NAD^+ \quad NADH,\ H^+]{} R{-}CH_2{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_2{-}CO{\sim}SCoA$$

3-cétoacyl-coenzyme A

• **Thiolyse.** Catalysée par une 3-cétothiolase, en présence de coenzyme *A*.

$$R{-}CH_2{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_2{-}CO{\sim}SCoA + HSCoA \longrightarrow CH_3{-}CO{\sim}SCoA + R{-}CH_2{-}CO{\sim}SCoA$$

Acétyl CoA — Acyl CoA à $(n-2)$ carbones

C. L'hélice de Lynen

La dernière étape nous ramène au point de départ mais avec deux carbones de moins. La dégradation peut recommencer et Lynen a schématisé le cycle de réactions par une figure dite « hélice de Lynen » dont chaque tour de spire correspond à la perte d'un acétyl-coenzyme *A* et de quatre atomes d'hydrogène (fig. 7.2).

Les acides gras possédant un nombre pair d'atomes de carbone, on passe successivement de 18 à 16, puis 14, ..., 6, 4 et 2 atomes de carbone. La dernière spire débute donc au butyryl-coenzyme *A*, passe par le β-hydroxybutyryl-coenzyme *A* et se termine à l'acétoacétyl coenzyme *A* :

$$CH_3{-}CO{-}CH_2{-}CO \sim SCoA$$

qui par thiolyse est scindé en deux molécules d'acétyl-coenzyme *A*, produit final de la dégradation.

D. Bilan de l'oxydation d'un acide gras

La β-oxydation d'un acide gras courant, l'acide palmitique par exemple, se résume donc par l'équation bilan :

$$C_{15}H_{31}{-}COOH + ATP + 8\ HSCoA + 7\ FAD + 7\ NAD^+ + 8\ H_2O \rightarrow$$
$$8\ CH_3CO \sim SCoA + AMP + 2\ P_i + 7\ FADH_2 + 7\ NADH,\ H^+ .$$

Ce bilan montre que deux liaisons riches en énergie sont consommées pour activer l'acide gras :

$$ATP + 2\ H_2O \rightarrow AMP + 2\ P_i .$$

Chaque tour de spire de l'hélice de Lynen produit :

— 1 $FADH_2$
— 1 NADH, H^+
— 1 acétyl CoA

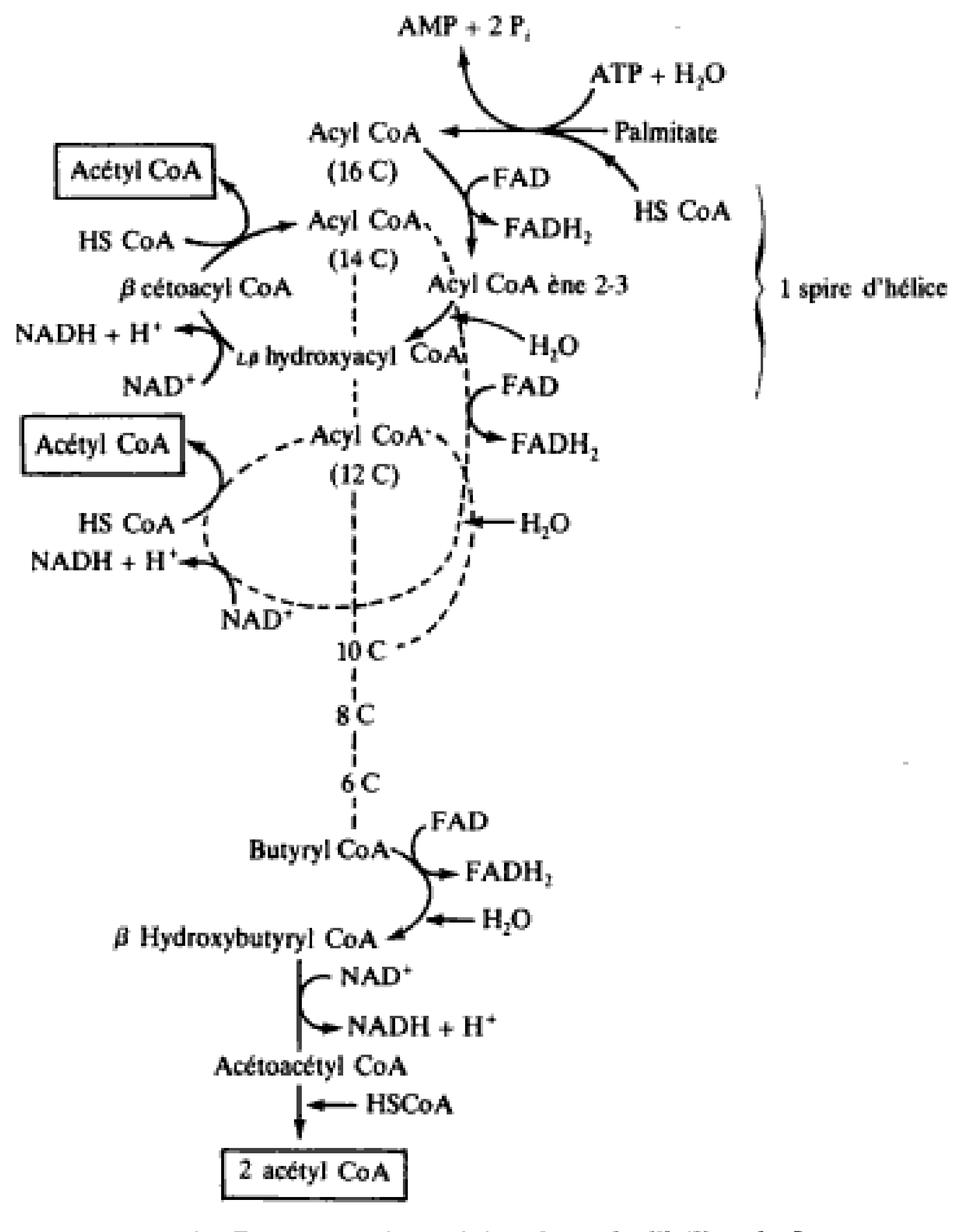


Figure 7.2 Représentation schématique de l'hélice de Lynen.

sauf le dernier tour qui libère :

— 1 $FADH_2$
— 1 NADH, H^+
— 2 acétyl CoA.

L'oxydation complète de l'acide palmitique aboutit au dioxyde de carbone et à l'eau :

— la réoxydation de 7 $FADH_2$ par la chaîne respiratoire produit $7 \times 2 = 14$ ATP

— la réoxydation de 7 NADH, H^+ par la chaîne respiratoire produit $7 \times 3 = 21$ ATP

— l'oxydation de 8 CH_3—CO ~ SCoA par le cycle de Krebs produit $8 \times 12 = 96$ ATP.

Le bilan énergétique s'établit à $(96 + 21 + 14) - 2 = 129$ ATP libérés par l'oxydation complète d'une molécule d'acide palmitique.

E. Catabolismes particuliers

• **Oxydation des acides gras insaturés**

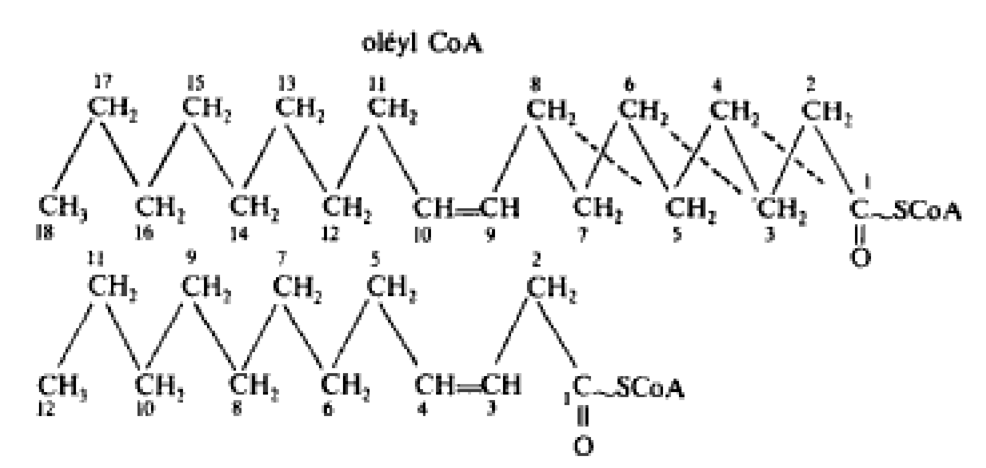
La β-oxydation des acides gras insaturés procède selon un mécanisme identique à celui des acides gras saturés jusqu'à ce que la dégradation vienne buter sur une double liaison.

Le résidu d'acyl CoA résultant de cette dégradation partielle n'est pas substrat des enzymes de la β-oxydation ; le substrat de l'hydratase (crotonase) est un trans-déhydro-ène 2-3-acyl CoA :

R—CH$_2$ H
C=C
3 2
H $_1$C~SCoA
‖
O

alors que le résidu d'acyl CoA en cours de dégradation possède une structure différente.

En prenant comme exemple l'acide oléique, l'acyl CoA résiduel est un cis-déhydro-ène 3-4 acyl CoA en C_{12}.



cis-déhydro-ène-3-4 lauryl CoA

Une enzyme supplémentaire intervient alors, à ce stade de l'oxydation de l'acide gras insaturé : **la déhydroacyl CoA isomérase,** qui catalyse la conversion du cis-déhydro-ène-3-4 acyl CoA en trans-déhydro-ène 2-3 acyl CoA, ce qui permet à la crotonase de l'hydrater en L-3 hydroxyacyl CoA et par conséquent autorise la poursuite de la β-oxydation. Ce mécanisme adjuvant est suffisant pour l'oxydation des acides gras mono-insaturés, comme l'acide oléique ou l'acide palmitoléique, mais ne l'est pas pour les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléïque ou l'acide linolénique.

En prenant comme exemple l'acide linoléïque, l'enlèvement de 5 chaînons dicarbonés à partir du linoléyl CoA aboutit au cis-déhydro-ène-2-3 caprilyl CoA (en C_8).

Bilan de la synthèse d'acide acétyl acétique (acide 3-céto-butanoïque).

Le bilan de la synthèse d'une molécule d'acide acétylacétique (acide 3 céto-butanoïque) peut s'écrire :

$$2\,CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{\sim}SCoA + H_2O \rightarrow 2\,HSCoA + CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_2{-}COOH$$

Un certain nombre de raisons sont invoquées afin d'expliquer la cétogenèse, liée à l'accumulation d'acétyl coenzyme *A* en l'absence de glucides :

- l'absence de glucides est compensée par une augmentation du catabolisme des acides gras, qui provoque une surabondance d'acétyl CoA ;
- la carence glucidique entraîne un manque d'oxaloacétate, molécule nécessaire à l'oxydation de l'acétyl CoA ;
- la troisième explication est le déséquilibre entre le catabolisme et l'anabolisme des acides gras ; en absence de NADPH, H^+ leur synthèse est impossible, or la seule origine du NADPH, H^+ est le catabolisme glucidique.

III. BIOSYNTHÈSE DES ACIDES GRAS

La synthèse des acides gras procède selon deux mécanismes, il existe un système cytoplasmique, très actif, qui permet la synthèse de l'acide palmitique et un système essentiellement microsomal qui permet l'allongement et la désaturation des chaînes d'acides gras.

A. La synthèse cytoplasmique de l'acide palmitique

Le bilan de la synthèse d'une molécule d'acide palmitique peut s'écrire :

$$\text{Acétyl CoA} + 7\ \text{Malonyl CoA} + 14\ \text{NADPH, } H^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow CH_3{-}(CH_2)_{14}{-}COOH + 7\,CO_2 + 8\ \text{CoASH} + 14\ \text{NADP}^+ + 6\,H_2O$$

Les caractéristiques de cette biosynthèse peuvent se résumer de la façon suivante :

- La biosynthèse des acides gras est réalisée selon un processus différent de celui de leur dégradation : localisation et enzymes ne sont pas les mêmes.
- L'incorporation d'un chaînon dicarboné dans une molécule d'acide gras en voie de synthèse est faite par l'intermédiaire d'un composé à trois carbones : le malonyl coenzyme *A* :

$$COOH{-}CH_2{-}CO \sim SCoA\ .$$

- Le pouvoir réducteur est fourni par le NADPH, H^+.
- Les dérivés acylés intermédiaires ne sont pas sous forme d'esters du coenzyme *A*, ils se présentent sous forme de thioesters d'une protéine appelée ACP : ***acyl carrier protein***.

• Les enzymes responsables de cette synthèse forment un complexe appelé acide gras synthétase dont le degré de cohésion varie selon les espèces : chez E. coli les enzymes sont actives sous forme dissociée, en revanche chez les Eucaryotes, les sous-unités forment un complexe multienzymatique défini.

1. LA FORMATION DU MALONYL COENZYME *A*

Le bilan de la biosynthèse d'une molécule d'acide palmitique montre que les chaînons dicarbonés sont apportés par le malonyl CoA. Cet intermédiaire fondamental de la synthèse des acides gras est élaboré à partir de l'acétyl CoA ; la réaction de carboxylation est catalysée par une enzyme à biotine appelée l'acétyl CoA carboxylase.

$$CH_3{-}CO{\sim}SCoA + CO_2 \xrightarrow[ATP + H_2O \;\to\; ADP + P_i]{\text{Acétyl CoA carboxylase}} COOH{-}CH_2{-}CO{\sim}SCoA$$

La réaction représente l'étape régulatrice de la voie de biosynthèse des acides gras, l'acétyl CoA carboxylase est une enzyme allostérique activée par le citrate.

L'acétyl CoA, précurseur de la synthèse des acides gras, est formé dans la mitochondrie des cellules eucaryotes (décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique, β-oxydation), le transfert d'une molécule d'acétyl CoA du compartiment mitochondrial vers le compartiment cytoplasmique est réalisé par le passage d'une molécule de citrate, selon la figure 7.4.

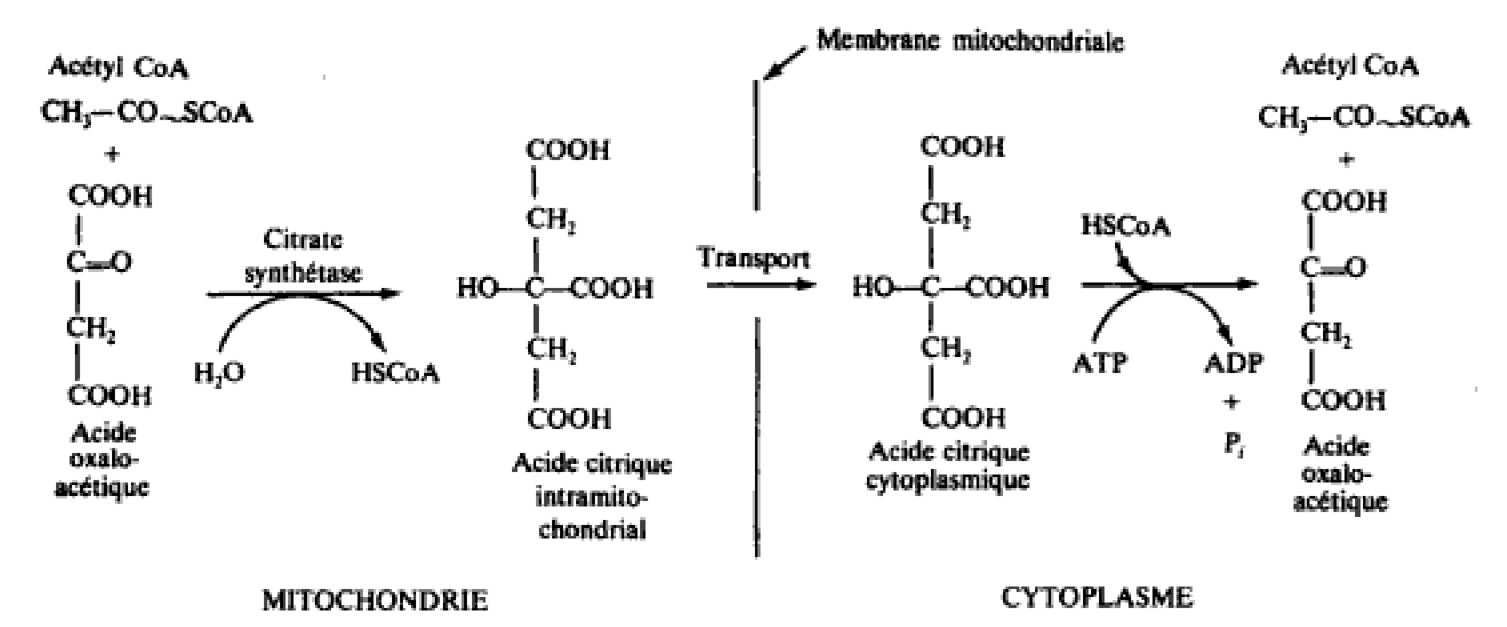


Figure 7.4 Mécanisme du passage de l'acétyl CoA vers le cytoplasme.

2. L'ACP : « ACYL CARRIER PROTEIN »

L'ACP ou acyl carrier protein joue dans la synthèse des acides gras le même rôle que le coenzyme *A* dans leur catabolisme, celui de transporteur et d'activateur

des acyles intermédiaires. L'ACP est une petite protéine qui possède un groupement prosthétique constitué de phosphopantéthéine, identique à celui du coenzyme *A* terminé par un groupement sulfhydryle SH sur lequel se fixera le carboxyle de l'acyle :

$$\mathrm{ACP{-}S} \sim \underset{\underset{\displaystyle O}{\|}}{C}\mathrm{{-}R}$$

On remarquera l'identité des groupements d'atomes réactifs responsables de l'activation des acides gras, dans le coenzyme *A* et dans l'ACP.

Chez E. coli, l'ACP est une protéine libre, chez les Eucaryotes, elle constitue la sous-unité centrale du complexe multienzymatique appelé acide gras synthétase.

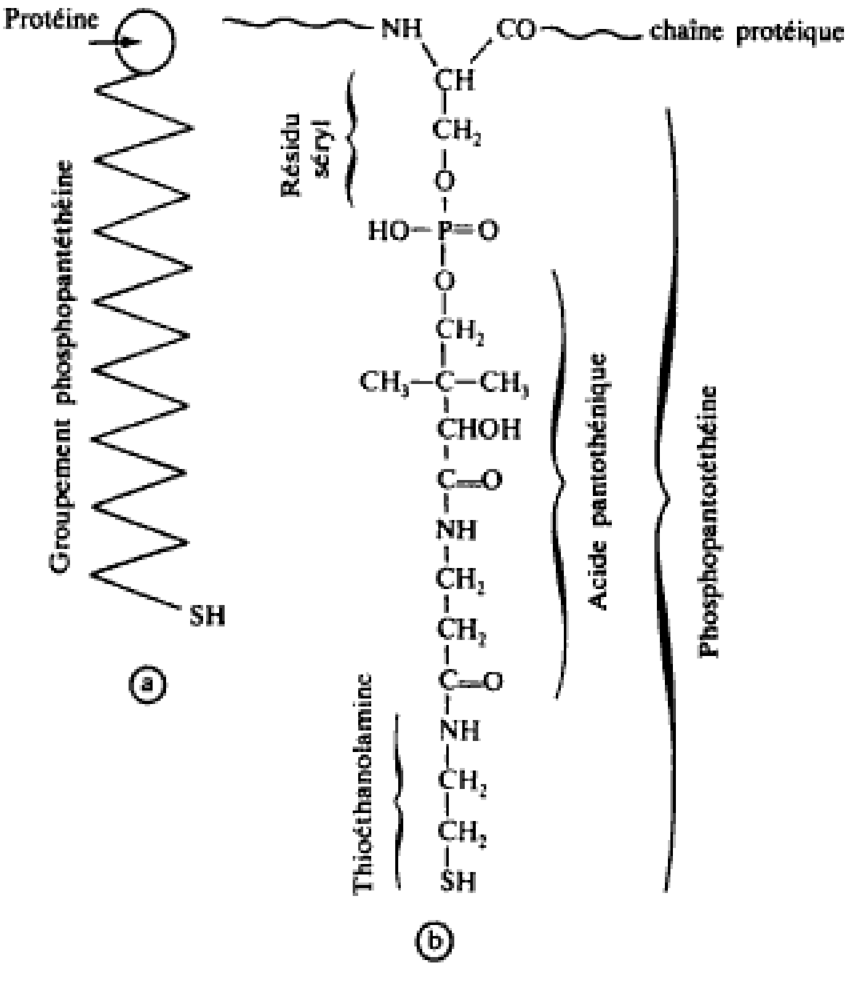


Figure 7.5 Structure de l'ACP.

a) Structure schématique.
b) Détail de la structure du groupement prosthétique.

Le transfert de l'acétyl coenzyme *A* et du malonyl coenzyme *A* sur l'ACP est catalysé par deux transacylases :

$$\text{Acétyl CoA} + \text{ACP}{-}\text{SH} \xrightarrow[\text{transacylase}]{\text{Acétyl CoA}} \text{acétyl ACP} + \text{CoA}{-}\text{SH}$$

$$\text{Malonyl CoA} + \text{ACP}{-}\text{SH} \xrightarrow[\text{transacylase}]{\text{Malonyl CoA}} \text{Malonyl ACP} + \text{CoA}{-}\text{SH}$$

3. LES ÉTAPES DE LA BIOSYNTHÈSE DE L'ACIDE PALMITIQUE

La biosynthèse commence par la condensation d'un composé dicarboné issu du malonyl ACP sur le groupement acétyle d'un acétyl ACP.

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-ACP + COOH-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-ACP \xrightarrow[\text{synthétase}]{\beta\text{-cétoacyl-ACP}} CO_2 + ACP + CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-ACP$$

β-céto-butanoyl-ACP

L'acétyl ACP sert d'amorce pour la synthèse, la molécule de dioxyde de carbone libérée est celle qui avait été incorporée lors de la synthèse du malonyl CoA.

Puis, le β-cétoacyl-ACP est réduit en β-hydroxyacyl-ACP par une transhydrogénase à $NADP^+$.

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SACP \xrightarrow[\text{réductase}]{\beta\text{-cétoacyl-ACP}} CH_3-CHOH-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SACP$$

NADPH, H^+ → $NADP^+$

β-hydroxy butanoyl-ACP

Ensuite, le β-hydroxyacyl-ACP est déshydraté en déhydroacyl-ACP (ou crotonyl-ACP).

$$CH_3-CHOH-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SACP \xrightarrow[\text{déshydratase}]{\beta\text{-hydroxyacyl-ACP}} CH_3-CH{=}CH-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SACP$$

→ H_2O

déhydro 2-3 butanoyl-ACP

Le déhydro 2-3 acyl-ACP est réduit en acyl-ACP par une déhydroacyl-ACP réductase à $NADP^+$.

$$CH_3-CH{=}CH-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SACP \xrightarrow[\text{réductase}]{\text{déhydroacyl-ACP}} CH_3-CH_2-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SACP$$

NADPH, H^+ → $NADP^+$

butanoyl-ACP

L'incorporation d'un chaînon dicarboné va se répéter six autres fois ; à chaque cycle, un malonyl-ACP introduit un chaînon acétyle sur le carboxyle de l'acide gras en cours de synthèse, un ACP-SH et une molécule de CO_2 sont libérés.

Les sous-unités de l'acide gras synthétase fonctionnent de façon coordonnée. Le degré d'organisation de ce complexe varie selon les espèces : chez E. coli les sous-unités existent sous forme indépendantes, chez les eucaryotes, il existe différents modes d'association des enzymes au sein d'un complexe intégré.

Dans le cas d'associations multienzymatiques fortement condensées, l'ACP occupe une position centrale dans le complexe et la chaîne phosphopantéthéinique assure le déplacement des résidus acyle d'une enzyme à l'autre.

Lorsque le palmityl-ACP est formé, l'acide palmitique est libéré par hydrolyse de la liaison thioester, sous l'action d'une désacylase.

$$CH_3-(CH_2)_{14}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-ACP + H_2O \xrightarrow{\text{désacylase}} CH_3-(CH_2)_{14}-COOH + ACP-SH\,.$$

La comparaison entre la voie de synthèse et la voie de dégradation des acides gras montre certaines similitudes, mais aussi des différences majeures : dans les deux cas, les acyles sont activés par des groupements phosphopantéthéine ; biosynthèse et dégradation mettent en jeu des déhydro 2-3 acyles, des 3 céto-acyles et des 3 hydro-acyles. En revanche les localisations cellulaires de ces deux voies sont différentes, la β-oxydation est intramitochondriale, la biosynthèse est cytoplasmique ; en outre la β-oxydation met en jeu des transhydrogénases à FAD et à NAD^+, la biosynthèse des transhydrogénases à $NADP^+$.

4. ORIGINE DU NADPH, H^+

L'anabolisme des acides gras est dépendant du catabolisme glucidique, le NADPH, H^+ est produit au cours des deux réactions d'oxydo-réduction de la voie des pentoses (p. 174) et au cours de la décarboxylation oxydative de l'acide malique :

$$\underset{\text{acide malique}}{COOH-CHOH-CH_2-COOH} \xrightarrow[NADP^+ \;\rightarrow\; NADPH,\, H^+]{\text{Enzyme malique}} CO_2 + \underset{\text{acide pyruvique}}{COOH-C{=}O-CH_3}$$

B. Allongement et désaturation des acides gras

Les modifications que subit l'acide palmitique pour être allongé et/ou désaturé sont essentiellement réalisées par des enzymes de la fraction microsomale.

On appelle microsomes les particules résultant de la désintégration du réticulum endoplasmique après homogénéisation de la cellule et fractionnement des unités sub-cellulaires.

A côté de ces enzymes liées à la membrane du réticulum endoplasmique, il existe un mécanisme d'allongement de l'acide palmitique, localisé dans les mitochondries et fonctionnant par réversibilité de la β-oxydation.

1. ALLONGEMENT DES CHAÎNES D'ACIDES GRAS

- **Le système mitochondrial d'allongement**

La chaîne d'acide palmitique, de même que celle de certains acides gras insaturés sont allongées dans la mitochondrie, les chaînons dicarbonés sont fournis par l'acétyl CoA. Les enzymes impliquées sont celles de la β-oxydation à l'exception de l'enzyme qui réduit le déhydro 2-3 acyl CoA en acyl CoA ; au cours de cette élongation c'est une transhydrogénase à $NADP^+$ qui agit, alors que celle qui catalyse la réaction inverse au cours de la β-oxydation est une flavoprotéine à FAD.

ou par phosphorylation du glycérol :

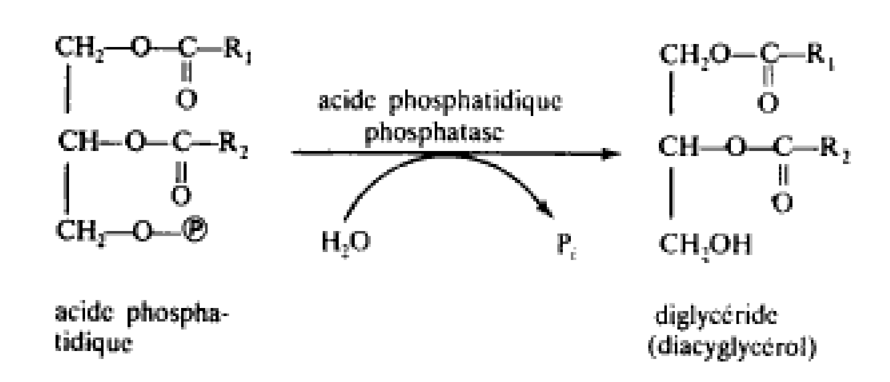
$$\underset{\text{glycérol}}{\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}} \xrightarrow[\text{ATP} \curvearrowright \text{ADP}]{\text{glycérol-kinase}} \underset{\text{glycérol-3-phosphate}}{\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2-O-P(=O)(OH)-OH \end{array}}$$

2. LA FORMATION DES TRIGLYCÉRIDES

Les acyl CoA sont donneurs de groupements acyle, deux d'entre eux interviennent dès la première étape qui est la synthèse d'une molécule d'acide phosphatidique :

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2-O-Ⓟ \end{array} + \begin{array}{l} R_1-C(=O) \sim SCoA \\ R_2-C(=O) \sim SCoA \end{array} \xrightarrow[\text{2 CoA-SH}]{\text{glycérol-phosphate-acyl-transférase}} \underset{\text{acide phosphatidique}}{\begin{array}{l} CH_2-O-C(=O)-R_1 \\ | \\ CH-O-C(=O)-R_2 \\ | \\ CH_2-O-Ⓟ \end{array}}$$

Les acides phosphatidiques soumis à une hydrolyse libèrent le phosphate et un diglycéride, ce dernier reçoit un troisième acyle, apporté par un acyl CoA, et se transforme en triglycéride.



$$\begin{array}{l} CH_2-O-C(=O)-R_1 \\ | \\ CH-O-C(=O)-R_2 \\ | \\ CH_2OH \end{array} \xrightarrow[R_3-C(=O) \sim SCoA \;\curvearrowright\; HSCoA]{\text{diglycéride acyltransférase}} \underset{\text{triglycéride (triacylglycérol)}}{\begin{array}{l} CH_2-O-C(=O)-R_1 \\ | \\ CH-O-C(=O)-R_2 \\ | \\ CH_2-O-C(=O)-R_3 \end{array}}$$

Remarque : La resynthèse des triglycérides dans la muqueuse intestinale lors de la digestion des graisses procède selon un mécanisme différent et met en jeu comme intermédiaires des monoglycérides (monoacylglycérols) et des diglycérides (diacylglycérols).

3. LA FORMATION DES PHOSPHOGLYCÉROLIPIDES

Le mécanisme de synthèse des phosphoglycérolipides est fondamentalement différent chez les bactéries et chez les animaux.

Phosphatidyl choline et phosphatidyl éthanolamine sont synthétisés à partir des 1-2 diglycérides (1-2 diacyl glycérols) et des amino-alcools correspondants sous forme activée : CDP choline et CDP éthanolamine.

NH_2
N
C
O N
CH_3
O O
$CH_3-N^+-CH_2-CH_2-O-P-O-P-O-CH_2$
OH OH
CH_3
O
OH OH

CDP Choline = cytidine diphosphate choline.

NH_2
N
C
O N
O O
$H_3N^+-CH_2-CH_2-O-P-O-P-O-CH_2$
OH OH
O
OH OH

CDP Ethanolamine = cytidine diphosphate éthanolamine.

résidus à 2 ou 5 atomes de carbones activés sous forme de thioester ou de pyrophosphate.

$$3\,C_2 \rightarrow C_6 \xrightarrow{-CO_2} C_5 \xrightarrow{+C_5} C_{10} \xrightarrow{+C_5} C_{15} \xrightarrow{+C_{15}} C_{30}$$

(acétyl CoA) squalène

La condensation de 3 molécules d'acétyl-CoA pour former le β-hydroxy-β-méthyl-glutaryl CoA est identique à celle rencontrée lors de l'étude de la cétogenèse (p. 187).

$CH_3-CO\sim SCoA$ (acétyl CoA) + $CH_3-CO\sim SCoA$ → $CH_3-CO-CH_2-CO\sim SCoA$ (acéto-acétyl CoA (3-cétobutanoyl CoA)) + HSCoA

acéto-acétyl CoA + $CH_3-CO\sim SCoA$ → $CH_3-C(OH)(CH_2-CO\sim SCoA)(CH_2-COOH)$ + HSCoA

β-hydroxy-β-méthyl glutaryl CoA (HMG CoA)

L'étape suivante comporte une double réduction en présence de NADPH, H^+ pour donner naissance au mévalonate qui est en équilibre avec sa forme lactonisée.

HMG CoA $CH_3-C(OH)(CH_2-CO\sim SCoA)(CH_2-COOH)$ + 2 NADPH, H^+ → 2 $NADP^+$ + CoASH + $CH_3-C(OH)(CH_2-CH_2OH)(CH_2-COOH)$ (Mévalonate)

Mévalonate → H_2O + Mévanololactone ($CH_3-C(OH)$ cyclique : $CH_2-CH_2-O-C(=O)-CH_2$)

Une décarboxylation au cours de laquelle sont consommées trois molécules d'ATP conduit à l'isopenténylpyrophosphate qui représente l'unité isoprénique (5C) biologique. Il est lui-même en équilibre avec son isomère le diméthylallyl-pyrophosphate.

mévalonate $CH_3-C(OH)(CH_2-CH_2OH)(CH_2-COOH)$ + 3 ATP → 3 ADP + P_i + CO_2 + $CH_2=C(CH_3)-CH_2-CH_2-O-PO(OH)-O-PO(OH)-OH$ (isopenténylpyrophosphate)

isopenténylpyrophosphate ⇅ $(CH_3)_2C=CH-CH_2-O-PO(OH)-O-PO(OH)-OH$ (diméthylallyl-pyrophosphate)

La condensation des deux formes isomères aboutit au géranyl-pyrophosphate (C_{10}), qui en se condensant lui-même avec une nouvelle molécule d'isopenténylpyrophosphate forme le farnésyl-pyrophosphate (C_{15}).

Isopentényl-pyrophosphate: $CH_2{=}C(CH_3){-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}Ⓟ{-}O{-}Ⓟ$ + diméthylallyl-pyrophosphate: $(CH_3)_2C{=}CH{-}CH_2{-}O{-}Ⓟ{-}O{-}Ⓟ$ → (− Ⓟ−O−Ⓟ) Géranyl-pyrophosphate: $(CH_3)_2C{=}CH{-}CH_2{-}CH_2{-}C(CH_3){=}CH{-}CH_2{-}O{-}Ⓟ{-}O{-}Ⓟ$

Géranyl pyrophosphate: $(CH_3)_2C{=}CH{-}CH_2{-}CH_2{-}C(CH_3){=}CH{-}CH_2{-}O{-}Ⓟ{-}O{-}Ⓟ$

+

Isopentényl pyrophosphate: $CH_2{=}C(CH_3){-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}Ⓟ{-}O{-}Ⓟ$

↓ (− Ⓟ−O−Ⓟ)

Farnésyl pyrophosphate: $(CH_3)_2C{=}CH{-}CH_2{-}CH_2{-}C(CH_3){=}CH{-}CH_2{-}CH_2{-}C(CH_3){=}CH{-}CH_2{-}O{-}Ⓟ{-}O{-}Ⓟ$

Une ultime condensation symétrique de deux unités de farnésyl pyrophosphate forme le squalène (C_{30}) (voir p. 200). La réaction, qui est catalysée enzymatiquement au niveau des microsomes du foie, consomme une molécule de NADPH, H^+ pour former la liaison C—C.

D'où l'équation globale :

$$18\ \text{acétyl CoA} + 6\ H_2O \xrightarrow[13\ \text{NADPH, } H^+ \ \rightarrow\ 13\ \text{NADP}^+]{18\ \text{ATP} \ \rightarrow\ 18\ \text{ADP} + 6\ P_i + 6\ PP} \text{Squalène} + 6\ CO_2 + 18\ \text{HSCoA}$$

Le squalène

qui met en évidence la consommation importante d'acétyl-CoA, d'ATP et de NADPH, H^+ lors de cette biosynthèse.

La seconde phase qui correspond à la cyclisation du squalène et sa transformation en cholestérol comporte :

— une oxydation, en présence de NADPH, H^+ et d'oxygène moléculaire qui aboutira en définitive à la fixation d'un hydroxyle en 3 sur le stérol ;

— une cyclisation accompagnée de réarrangements qui conduit en premier lieu au lanostérol, produit cyclique présentant une structure stérolique type. Chez les animaux, le lanostérol est le précurseur des autres stérols, ce qui n'est probablement pas le cas pour les phytostérols.

Le lanostérol possède trois groupements méthyle de plus que le cholestérol, ces derniers sont oxydés en groupement —COOH puis éliminés par décarboxylation, ainsi en plusieurs étapes le zymostérol est formé.

lanostérol

zymostérol

Le déplacement de la double liaison du cycle en 5-6, et la saturation de la double liaison de la chaîne sont des transformations qui assurent la transformation du zymostérol en cholestérol.

Zymostérol

2[H]

7-Déhydrodesmostérol

2[H]

7-Déhydrocholestérol

2[H]

cholestérol

Toutes ces réactions enzymatiques sont caractérisées par une stéréospécificité très étroite.

Le cholestérol est le point de départ de la synthèse de divers stéroïdes : vitamine D_3 (cholécalciférol), sels biliaires, hormones stéroïdes.

B. La biosynthèse des terpènes

La biosynthèse des terpènes qui sont des composés typiquement d'origine végétale est réalisée selon les mêmes principes que celles du squalène soit :

— des condensations successives d'isopentényl-pyrophosphate qui allongent la chaîne de 5 atomes de carbone ; soit :

— des condensations symétriques analogues à celles du farnésyl-pyrophosphate qui doublent le nombre d'atomes de carbone.

On distingue ainsi :

- *les monoterpènes* (C_{10}) et les sesquiterpènes (C_{15}) qui entrent dans la composition des essences végétales. ***Ex.*** : géraniol, menthol, santonine ;
- *les diterpènes* (C_{20}) auxquels on peut rattacher le phytol et le rétinol ou vitamine A ;
- *les triterpènes* (C_{30}) dont nous connaissons l'exemple du squalène ;
- *les tétraterpènes* (C_{40}) qui constituent le groupe des caroténoïdes. ***Ex.*** : β carotène, lycopène ;
- *les polyterpènes* (C_{25} à C_{110}) auxquels se rattachent les quinones (ubiquinones, plastoquinones) ; vitamines K, ainsi que les latex ou caoutchouc.

8

Le métabolisme des acides aminés

Les acides aminés sont à la fois les précurseurs et les produits de dégradation des protéines, ils jouent un rôle capital dans l'élaboration et le maintien de la matière vivante ; ils proviennent soit d'une synthèse endogène, soit de l'alimentation, soit enfin de la dégradation ou du renouvellement des protéines circulantes et tissulaires. Comme il n'existe pas de réserve en acides aminés, les interrelations avec les métabolismes glucidique et lipidique contribuent à équilibrer les échanges d'azote aminé et les adapter aux besoins cellulaires.

Le cycle de l'azote dans la biosphère est entièrement dépendant des micro-organismes, des phénomènes capitaux tels que :

— la fixation de l'azote atmosphérique
— la nitrification
— l'ammonification de l'azote organique

sont assurés en partie ou en totalité par les bactéries, les cyanophycées et les champignons inférieurs (fig. 8.1).

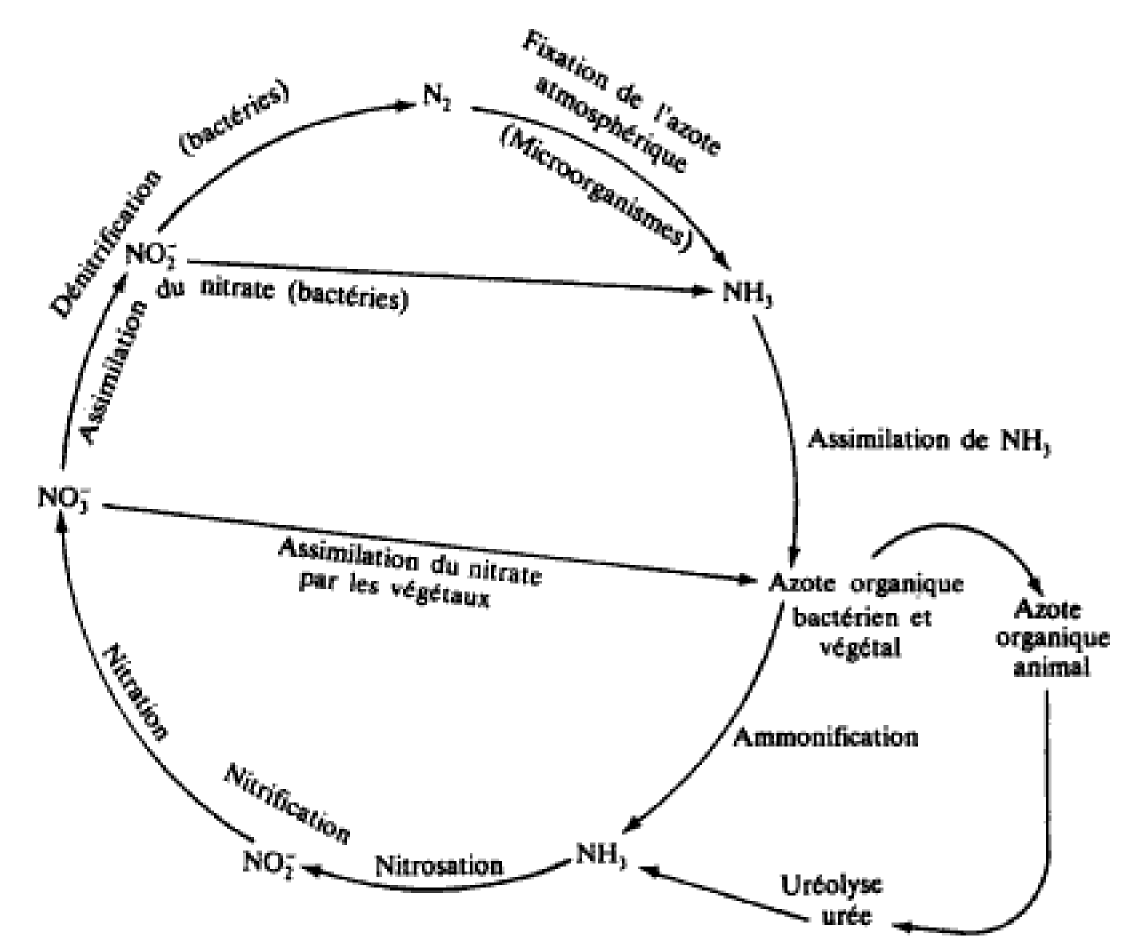


Figure 8.1 Cycle de l'azote dans la biosphère.

Les organismes vivants ont à l'égard de l'azote aminé des exigences variables, certains, les bactéries prototrophes, sont capables d'utiliser l'ammonium (NH_4^+) pour synthétiser les acides aminés et les autres molécules azotées organiques ; d'autres, les végétaux supérieurs, utilisent le nitrate (NO_3^-) ; en revanche, les animaux n'utilisent l'azote que sous forme organique. Les acides aminés indispensables doivent être fournis préfabriqués dans la ration alimentaire, les autres sont formés au cours de réactions de transfert du groupement $—NH_2$ d'un acide aminé sur une molécule carbonée.

I. LE CATABOLISME DES ACIDES AMINÉS

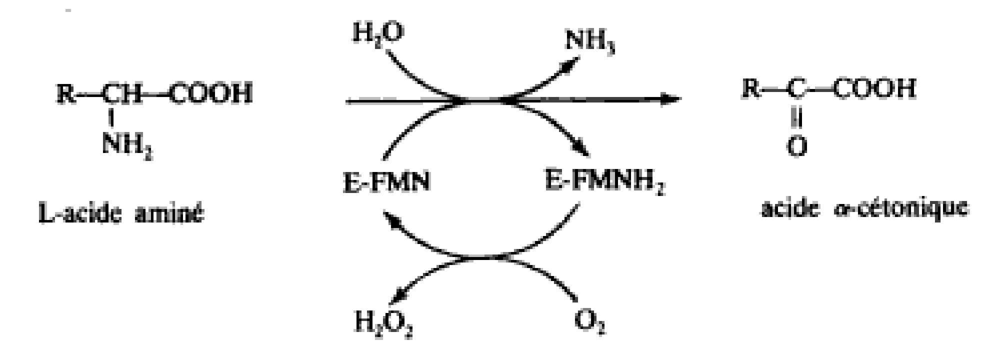
A. Le catabolisme des acides aminés dans la cellule animale

1. LA DÉSAMINATION OXYDATIVE

Tous les vertébrés excrètent l'azote aminé, sous forme d'urée (mammifères), d'ammoniac (poissons), ou d'acide urique (oiseaux, reptiles).

Dans le schéma général, le catabolisme des acides aminés commence par une désamination oxydative, dans de nombreux organismes on trouve plusieurs types d'aminoacides déshydrogénases, dont certaines n'exercent qu'un rôle mineur.

L'une est une flavoprotéine auto-oxydable à FMN, spécifique des aminoacides en configuration L, appelée L-aminoacide oxydase :



Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2, est ensuite décomposé par une catalase

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + 1/2\ O_2$$

La participation de cette enzyme au catabolisme général des acides aminés peut être considérée comme négligeable.

L'autre est une flavoprotéine auto-oxydable à FAD, spécifique des aminoacides en configuration D, appelée D-aminoacide oxydase.

Cette enzyme est très active, bien que ses substrats (les D-aminoacides) ne se rencontrent pas dans les conditions naturelles ; c'est un fait paradoxal dont la signification est discutée.

Pour les transaminases que l'on trouve chez les animaux, un couple de substrats tels que

$$R_1-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH \quad \text{et} \quad R_1-CH(NH_2)(COOH)$$

est constitué des acides α-cétoglutarique et glutamique, l'autre couple peut varier.

Le phosphate de pyridoxal, coenzyme groupement prosthétique, se combine transitoirement au groupement NH_2 pour former la pyridoxamine-phosphate selon un mécanisme ping-pong décrit page 102.

Deux transaminases ont un rôle essentiel dans le métabolisme des acides aminés ; l'enzyme la plus répandue est la **glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) également appelée aspartate aminotransférase (ASAT)** qui catalyse la réaction :

glutamate + oxaloacétate ⇄ α-céto-glutarate + aspartate ;

vient ensuite la glutamate pyruvate transaminase (GPT) également appelée alanine aminotransférase (ALAT) qui catalyse la réaction :

glutamate + pyruvate ⇄ α-céto-glutarate + alanine .

La transamination est un *processus de dégradation* au cours duquel le groupement aminé transféré à l'α-cétoglutarate peut ensuite participer à la formation de l'urée. Pour les acides aminés non transaminables, la lysine en particulier, le mécanisme de dégradation est différent, spécifique de l'acide aminé considéré.

La transamination est aussi un *processus de synthèse* permettant l'élaboration d'un acide aminé à partir de l'acide cétonique correspondant. A ce point de vue on peut distinguer :

• **Les aminoacides transaminables** dont la copule hydrocarbonée est synthétisée dans le métabolisme commun. Ces acides aminés dits *non indispensables* pour l'organisme comprennent : l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la cystine, la glycine, la proline et l'hydroxyproline, la sérine, la tyrosine. L'arginine appartient à ce groupe chez l'adulte, mais chez le jeune en croissance la vitesse de synthèse est insuffisante pour satisfaire les besoins.

• **Les aminoacides non transaminables** ou pour lesquels l'organisme ne peut réaliser la synthèse de l'acide cétonique correspondant. Ils sont dits *essentiels ou indispensables* puisqu'ils doivent être fournis par les aliments. Tel est le cas pour notre organisme des huit aminoacides suivants : isoleucine, leucine, valine, méthionine, thréonine, lysine, phénylalanine, tryptophane.

4. AUTRES MODES DE DÉSAMINATION

Il en existe plusieurs. Par exemple :

— *Désamination comportant une déshydratation* comme c'est le cas pour la sérine sous l'influence de la sérine déshydrase dont le coenzyme est le pyridoxal phosphate :

$$CH_2OH{-}CH(NH_2){-}COOH \xrightarrow{-H_2O} CH_2{=}C(NH_2){-}COOH \longrightarrow CH_3{-}C({=}NH){-}COOH \xrightarrow[-NH_3]{+H_2O} CH_3{-}C({=}O){-}COOH$$

sérine — acide α-amino acrylique — acide α-imino pyruvique — acide pyruvique

Une réaction analogue est possible à partir de la thréonine.

La cystéine est désaminée selon un mécanisme similaire par une cystéine desulfhydrase.

— *Désamination désaturante* comportant la formation d'une double liaison. Ainsi l'histidine est désaminée en urocanate qui conduit ensuite par ouverture du noyau imidazole à l'α-formimino-L-glutamate.

histidine (imidazole–$CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$) $\xrightarrow{-NH_3}$ urocanate (imidazole–$CH{=}CH{-}COOH$) $\longrightarrow$ $HOOC{-}CH(HN{-}CH{=}NH){-}CH_2{-}CH_2{-}COOH$

α formimino-L-glutamate

5. LA DÉCARBOXYLATION DES AMINOACIDES

En présence de décarboxylases spécifiques, les acides aminés peuvent former du dioxyde de carbone et une amine selon la réaction générale :

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH \xrightarrow[\text{(PLP)}]{aa\ \text{décarboxylase}} R{-}CH_2{-}NH_2 + CO_2$$

Le coenzyme est le pyridoxal phosphate. L'importance de cette transformation est quantitativement négligeable, elle n'a de signification que grâce aux propriétés des amines formées.

Ex. : La décarboxylation de histidine conduit à *l'histamine*, qu'une histaminase oxyde en aldéhyde :

imidazole (HN, N)–$CH_2{-}CH_2{-}NH_2$

histamine

7. LES DESTINÉES DE LA COPULE CARBONÉE

La chaîne hydrocarbonée, résultant de la perte du groupement NH_2 s'intègre au métabolisme selon sa structure. Certains acides aminés dont la voie métabolique passe par le pyruvate ou un composé voisin s'intègrent à la voie des glucides. Ce sont des **amino-acides glucoformateurs.** Les autres ont une séquence de transformation qui aboutit à l'acétyl-coenzyme A, ils sont dit cétogènes ; certains sont en partie glucoformateurs et en partie cétogènes, ils sont mixtes.

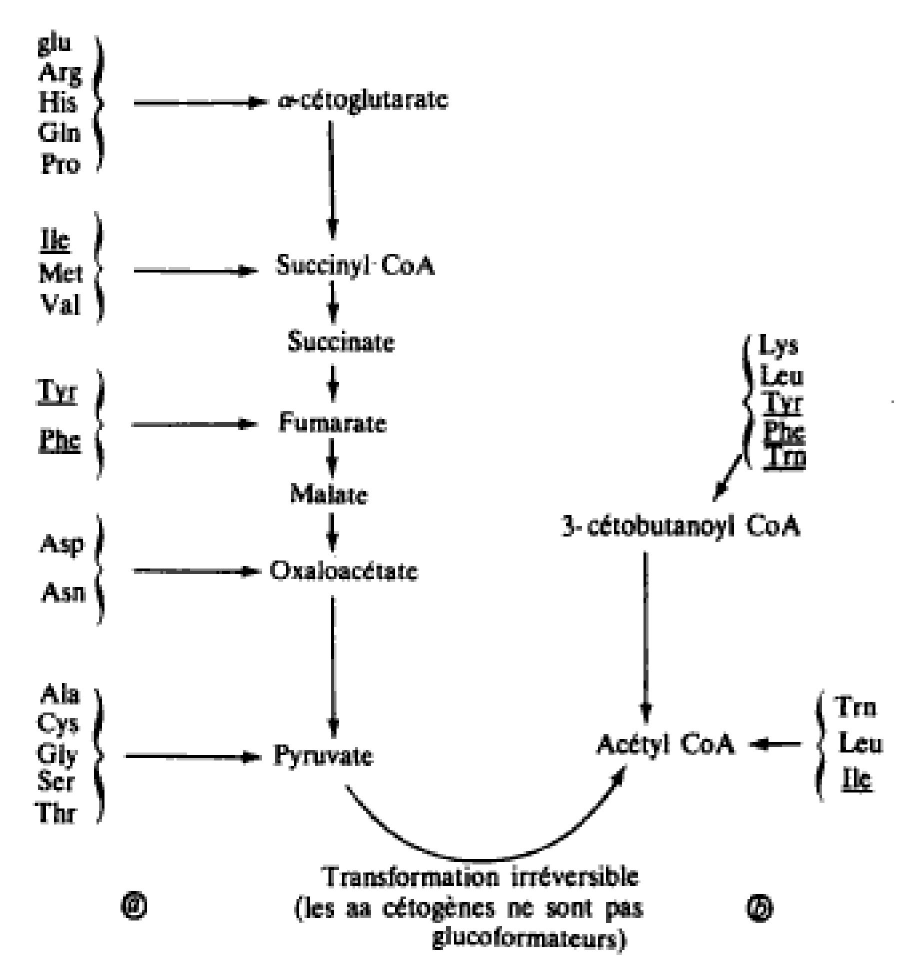


Figure 8.3 Destinées de la copule carbonée des acides aminés.
a) Les acides aminés glucoformateurs.
b) Les acides aminés cétogènes.
Les acides aminés soulignés sont mixtes.

Exemples :

- Transamination de l'alanine en présence d'ALAT (GPT) :

$$\text{alanine} + \alpha\text{-cétoglutarate} \rightleftharpoons \text{pyruvate} + \text{glutamate} .$$

- La phénylalanine et la tryosine sont cétogènes et glucoformateurs ; le premier est un acide aminé essentiel qui s'oxyde facilement et irréversiblement en tyrosine.

Lors du catabolisme, la tyrosine est transaminée en *p*-hydroxyphényl-pyruvate en présence d'α-cétoglutarate. Après oxydation et décarboxylation il y a formation

d'acide homogentisique ou alcaptone. Enfin, une nouvelle oxydation suivie d'une ouverture du cycle conduit à un mélange de fumarate et d'acétoacétate.

phénylalanine → Tyrosine ⇢ Homogentisate ⇢ fumarate + acétoacétate

Ces transformations peuvent être à l'origine d'erreurs du métabolisme.

• **L'oligophrénie phényl-pyruvique ou phényl-cétonurie** est caractérisée par l'association de troubles mentaux et la présence d'acide phényl-pyruvique dans les urines (coloration verte par le perchlorure de fer). C'est une maladie familiale et héréditaire.

La « lésion biochimique » est une carence enzymatique qui empêche la transformation de phénylalanine en tyrosine : la transamination porte alors sur la phénylalanine et aboutit à l'acide phényl-pyruvique :

$$\varphi-CH_2-CO-COOH$$

Le tryptophane peut être catabolisé après ouverture du noyau pyrrole en divers composés qui peuvent conduire à l'acide nicotinique. Il est également le point de départ de la synthèse des phytohormones de croissance ou auxines tels que l'acide indol-acétique que l'on trouve par ailleurs dans l'urine des patients atteints de phénylcétonurie.

Cynurénine — Acide anthranilique — Acide nicotinique — Acide indolacétique

B. Le catabolisme des acides aminés chez les bactéries

De nombreuses bactéries, les Entérobactéries en particulier, possèdent deux voies de dégradation des acides aminés ; ces derniers sont catabolisés de façon différente en milieu acide et en milieu alcalin.

En milieu acide, à $pH < 6$, la synthèse et l'activité des décarboxylases sont favorisées ; en milieu alcalin, à $pH > 7$, c'est la synthèse et l'activité des désaminases qui l'emportent.

1. LA DÉSAMINATION

Le mécanisme le plus général est la désamination oxydative

$$R-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow[H_2O \quad 2[H]]{} R-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-COOH + NH_3$$

Les aminoacides déshydrogénases, appelées également désaminases, sont peu spécifiques et induites par leur substrat ; elles sont très répandues, sauf celles qui agissent sur les acides aminés cycliques : phénylalanine désaminase (PDA) et tryptophane désaminase (TDA).

$$C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow[H_2O \quad PDA \quad NH_3]{NAD^+ \quad NADH, H^+} C_6H_5-CH_2-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-COOH$$

phénylalanine → acide phényl pyruvique

$$\text{Indole}-CH_2-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow[H_2O \quad TDA \quad NH_3]{NAD^+ \quad NADH, H^+} \text{Indole}-CH_2-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-COOH$$

tryphtophane → acide indole pyruvique

Chez les bactéries anaérobies strictes, il existe un mécanisme de désamination couplée faisant intervenir deux acides aminés, un réducteur et un oxydant.

$$R-CH(NH_2)-COOH + R'-CH(NH_2)-COOH + H_2O \rightarrow R-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-COOH + R'-CH_2-COOH + 2\ NH_3$$

2. LA DÉCARBOXYLATION

Les décarboxylases (enzymes à pyridoxal phosphate) catalysent la réaction suivante :

$$R-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow{\text{acide aminé décarboxylase}} CO_2 + R-CH_2-NH_2$$

Les amines qui résultent de cette réaction sont toxiques, particulièrement celles qui proviennent des acides aminés basiques (l'ornithine est décarboxylée en putrescéine, la lysine en cadavérine).

Les décarboxylases bactériennes sont très spécifiques, certaines sont recherchées en vue de l'identification des germes.

C. La biosynthèse des acides aminés

C'est un ensemble complexe de transformations donnant lieu à de nombreux phénomènes de régulation pour lequel nous limiterons notre étude à quelques remarques essentielles.

• Le glutamate et la glutamine jouent un rôle essentiel dans le transport du groupement NH_2 chez les animaux, chez les végétaux l'aspartate et l'asparagine assurent cette fonction de façon prédominante.

• Le glutamate résulte soit d'une amination réductrice de l'α-cétoglutarate catalysée par la *glutamate déshydrogénase*, soit d'une transamination avec un certain nombre d'aminoacides. Le glutamate est lui-même transaminable avec l'oxaloacétate pour former l'aspartate. La synthèse de ce dernier composé peut résulter, dans des organismes végétaux et bactériens, d'une amination réductrice de l'oxaloacétate, ou d'une amination directe du fumarate.

L'α-cétoglutarate, l'oxaloacétate et le fumarate sont des étapes du cycle des acides tricarboxyliques, il y a donc là des points de convergence pour ces différents métabolismes.

• Le passage aux amides correspondantes se fait par fixation directe d'ammoniac en présence d'ATP fournissant l'énergie.

$$\text{glutamate} + NH_3 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{glutamine-synthétase}} \text{glutamine} + \text{ADP} + P_m .$$

— *Les voies de synthèse des aminoacides* peuvent être rattachées à un nombre limité de composés du métabolisme commun ou du métabolisme glucidique : pyruvate, oxaloacétate, α-cétoglutarate, phosphoglycérate et pentoses. On distingue ainsi :

• Les dérivés du pyruvate : alanine, valine, leucine.

• Les dérivés du phosphoglycérate : sérine, glycine, cystéine.

• Les dérivés de l'oxaloacétate : aspartate, lysine, thréonine, méthionine, isoleucine ainsi que le diaminopimélate qui est un constituant de la paroi bactérienne.

• Les dérivés de l'α-cétoglutarate : glutamate, proline et arginine ainsi que la lysine chez les levures et les moisissures (chez les bactéries et les plantes vasculaires la synthèse de la lysine dérive de l'aspartate).

• Les dérivés d'oses : acides aminés aromatiques (phénylalaline, tyrosine, tryptophane) rattachés à l'érythrose-4-phosphate et l'histidine dérivant du ribose-5-phosphate.

— *Toutes ces voies nécessitent,* outre les substrats communs à tous les organismes et l'apport énergétique sous forme d'ATP en particulier, des équipements enzymatiques. Dans un organisme donné un grand nombre font souvent défaut et

l'aminoacide ou le groupe d'aminoacides devient pour lui essentiel ; on dit encore indispensable. Ainsi l'organisme humain ne synthétise aucun de ses acides aminés aromatiques, seul le passage de la phénylalanine vers la tyrosine est possible.

D. Métabolismes particuliers d'acides aminés

Les voies de transformations étudiées jusqu'alors présentaient une certaine généralité. A côté de celles-ci, chaque acide aminé peut, grâce à sa chaîne latérale participer à des métabolismes particuliers qui varient selon l'organisme considéré.

• **Le plus simple des aminoacides, la glycine, est à l'origine de l'ensemble des porphyrines.** Par condensation d'une molécule de glycine et d'une molécule de succinyl CoA il se forme de l'α-amino β-céto adipate qui est décarboxylé en δ-amino lévulinate en présence de pyridoxal phosphate. Deux molécules de δ-aminolévulinate peuvent alors former un noyau pyrrole substitué : le porphobilinogène.

succinyl ~ CoA + glycine —(HSCoA)→ $HOOC-CH_2-CH_2-CO-CH(NH_2)(COOH)$ —(CO_2)→ $HOOC-(CH_2)_2-CO-CH_2-NH_2$

α amino β cétoadipate — δ amino lévulinate

2 δ amino lévulinate —($2\ H_2O$)→ Porphobilinogène (HOOC–CH₂ ; COOH–CH₂–CH₂ ; CH₂–NH₂ ; N–H)

Quatre molécules de porphobilinogène peuvent former une porphyrine après élimination des groupements NH_2. Selon le mode de condensation et les transformations ultérieures (décarboxylations en particulier) on aboutit ainsi à l'ensemble de la série des porphyrines et de leurs dérivés comportant soit du fer (hèmes, hématines) soit du magnésium (chlorophylles).

• **La méthionine présente l'intérêt d'être à la fois un donneur de soufre** (transulfuration) **et de groupements méthyle** (transméthylation).

— Après déméthylation en homocystéine il y a condensation avec la sérine pour former de la cystathionine qui peut être hydrolysée en homosérine et cystéine.

$$HS{-}(CH_2)_2{-}CH(NH_2){-}COOH \;+\; HOH_2C{-}CH(NH_2){-}COOH \xrightarrow{-H_2O} S{-}(CH_2)_2{-}CH(NH_2){-}COOH\;|\;CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH \xrightarrow{H_2O} HO{-}(CH_2)_2{-}CH(NH_2){-}COOH \;+\; HS{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$$

Homocystéine + Sérine → Cystathionine → Homosérine + Cystéine

— La méthionine qui est le principal donneur de groupement méthyle doit être préalablement activée par l'ATP pour former de la 5 S-adénosyl-méthionine dans laquelle le soufre est sous forme sulfonium.

$$\text{L Méthionine} + ATP \rightarrow CH_3{-}\overset{+}{S}(Ad){-}(CH_2)_2{-}CH(NH_2){-}COO^- + PP + P_m$$

S adénosylméthionine

Au cours du transfert du groupement méthyle la méthionine activée est transformée en homocystéine et le nucléoside est libéré. La fixation d'un groupement méthyle intervient dans de nombreuses synthèses aboutissant à des composés variés :

Créatine : $HN{=}C(NH_2){-}N(CH_3){-}CH_2{-}COOH$ (Arginine, Glycine, CH_3 : S adénosylméthionine)

Choline : $CH_3{-}\overset{+}{N}(CH_3)(CH_3){-}CH_2{-}CH_2OH$ (CH_3 : S adénosylméthionine)

Adrénaline : $(HO)_2C_6H_3{-}CHOH{-}CH_2{-}NH{-}CH_3$ (CH_3 : S adénosyl-méthionine)

Elle permet également certains processus de détoxication.

• **Les acides aminés aromatiques** sont les précurseurs de nombreux dérivés ayant une importance biologique primordiale.

— La tyrosine par oxydation est à l'origine des mélanines. Elle permet la biogenèse de la noradrénaline et des hormones thyroïdiennes.

$$HO\text{-},\ HO\text{-}C_6H_3\text{-}CHOH-CH_2-NH_2$$

noradrénaline

$$HO-C_6H_2I_2-O-C_6H_2I_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$$

T_4 = 3.5.3'5'-tétra-iodothyronine

— Le tryptophane peut être le précurseur de l'acide nicotinique et des auxines (p. 212).

— Chaque voie possède un composé intermédiaire commun :

- orotidine-5'-monophosphate pour la série pyrimidique,
- hypoxanthine-5'-monophosphate pour la série purique.

— Les biosynthèses passent donc toujours par le stade nucléoside-5'-monophosphate comportant un résidu ribosyl. Le passage à la série désoxy- se réalise par réduction du nucléotide déjà formé.

A. Biosynthèse des nucléotides pyrimidiques

1. LA FORMATION DU CARBAMYL ASPARTATE

A partir du carbamyl phosphate :

$$H_2N-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim O-Ⓟ$$

synthétisé d'une manière analogue à celle étudiée à propos du cycle de l'urée (p. 210), il y a condensation avec l'aspartate pour former du carbamyl phosphate.

Remarque : La synthèse du carbamyl phosphate est cytoplasmique à la différence de celle du cycle de l'urée qui est localisée dans les mitochondries des hépatocytes.

La synthèse du carbamyl aspartate est catalysée par une aspartate transcarbamylase, enzyme allostérique qui assure la régulation de cette voie de biosynthèse.

$H_2N-C(=O)\sim O-Ⓟ$ + $(NH_2)(COOH)CH-CH_2-COOH$ —Aspartate transcarbamylase→ $H_2N-C(=O)-NH-CH(COOH)-CH_2-COOH$ + P_i

Carbamyl phosphate — Aspartate — Carbamyl aspartate

L'enzyme oligomérique, constituée de sous-unités catalytiques et de sous-unités régulatrices, est inhibée allostériquement par le CTP. L'enzyme est du système K, la K_{50}, augmente avec la concentration du CTP, sans changement de V_M.

L'ATP s'oppose à l'action du CTP en empêchant la fixation de l'inhibiteur sur son site allostérique (fig. 9.1).

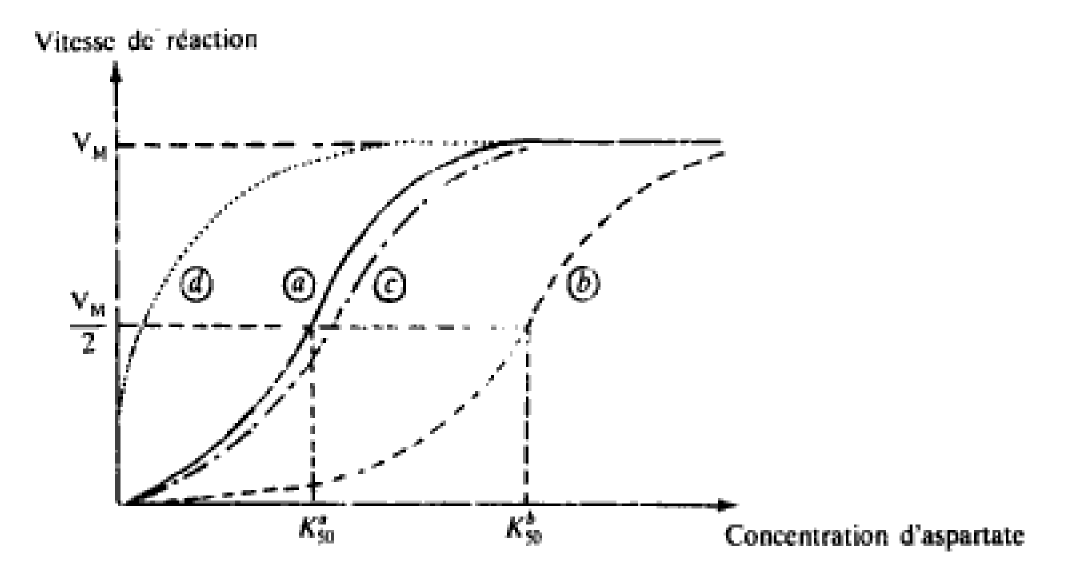


Figure 9.1 Courbe $v_i = f(s)$ pour l'aspartate transcarbamylase à concentration constante de carbamyl phosphate.

a) Courbe sans effecteur.
b) Courbe en présence de CTP.
c) Courbe en présence de CTP, à la même concentration qu'en ⓑ, mais en présence d'ATP.
d) Courbe sans effecteur, mais après dénaturation partielle à l'aide de sels mercuriques, les sous-unités n'interagissent plus les unes sur les autres, l'enzyme est désensibilisée, la cinétique est devenue michaelienne.

2. LA FORMATION DES PYRIMIDINES-5'-PHOSPHATE

Par déshydratation, il y a fermeture du cycle pyrimidique (acide dihydro-orotique) et par déshydrogénation en présence de NAD^+, formation d'orotate.

Carbamyl aspartate → (H_2O) → Dihydro-orotate → (NAD^+ → NADH, H^+) → Orotate

Forme tautomère de l'orotate

Figure 9.2 Synthèse de l'acide orotique.

Le ribose se fixe sur le cycle pyrimidique, la liaison N-osidique se formant entre l'orotate et le PRPP. L'orotidine-5'-monophosphate résultant est décarboxylé en uridine-5'-monophosphate (UMP).

Figure 9.3 Synthèse de l'UMP.

Dans certains cas une utilisation directe de l'uracile exogène paraît possible grâce à une phosphorylation à partir du ribose 1-phosphate.

Les pyrimidines-5'-monophosphate sont phosphorylées en pyrimidines-diphosphate, réaction catalysée par une nucléoside monophosphate kinase, l'ATP est le transporteur de phosphate. Les pyrimidines-triphosphate proviennent de la phosphorylation des pyrimidines-diphosphate, réaction catalysée par une nucléoside diphosphate kinase.

ATP ADP ATP ADP

UMP → (Nucléoside monophosphate kinase) → UDP → (Nucléoside diphosphate kinase) → UTP

Le passage à la cytidine 5'-triphosphate (CTP) est réalisé par amination de l'uridine 5'-triphosphate (UTP) selon le schéma suivant :

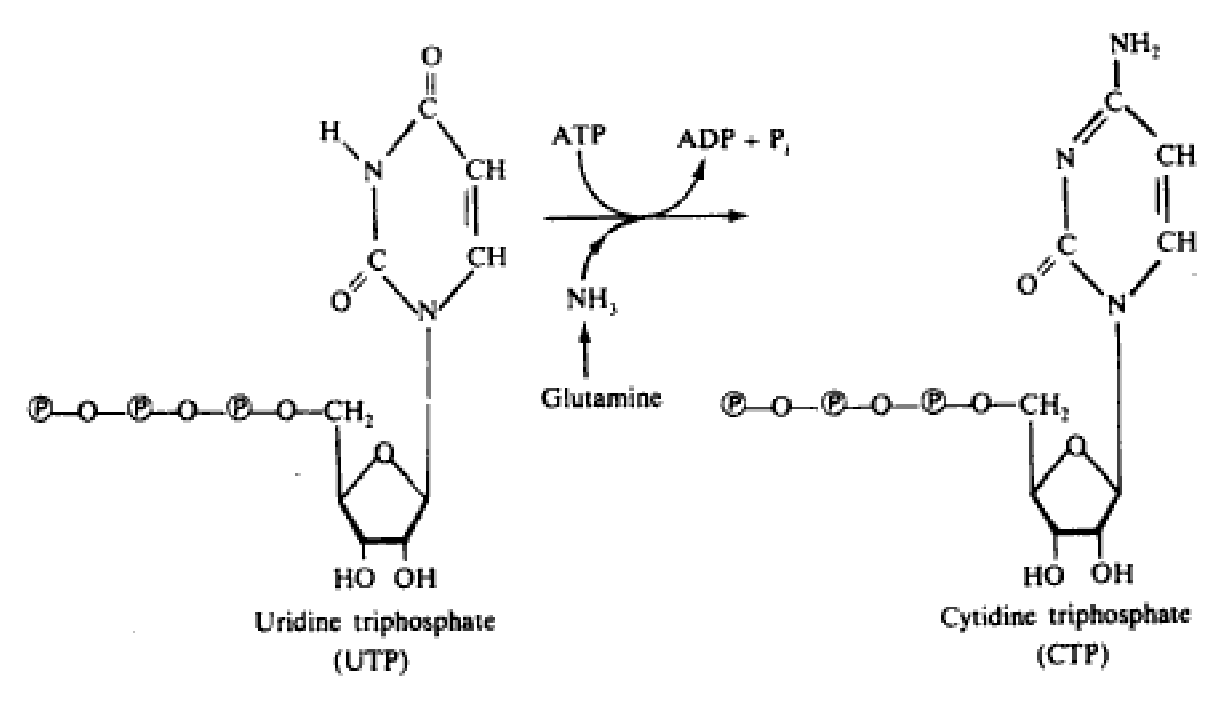


Figure 9.4 Passage de l'UTP au CTP.

La formation des désoxyribonucléotides a lieu par réduction de l'hydroxyle en 2' du ribose dans les nucléosides diphosphates, réaction catalysée par une nucléoside diphosphate réductase.

La thiorédoxine est un cofacteur protéique à groupements thiols qui joue le rôle de réducteur.

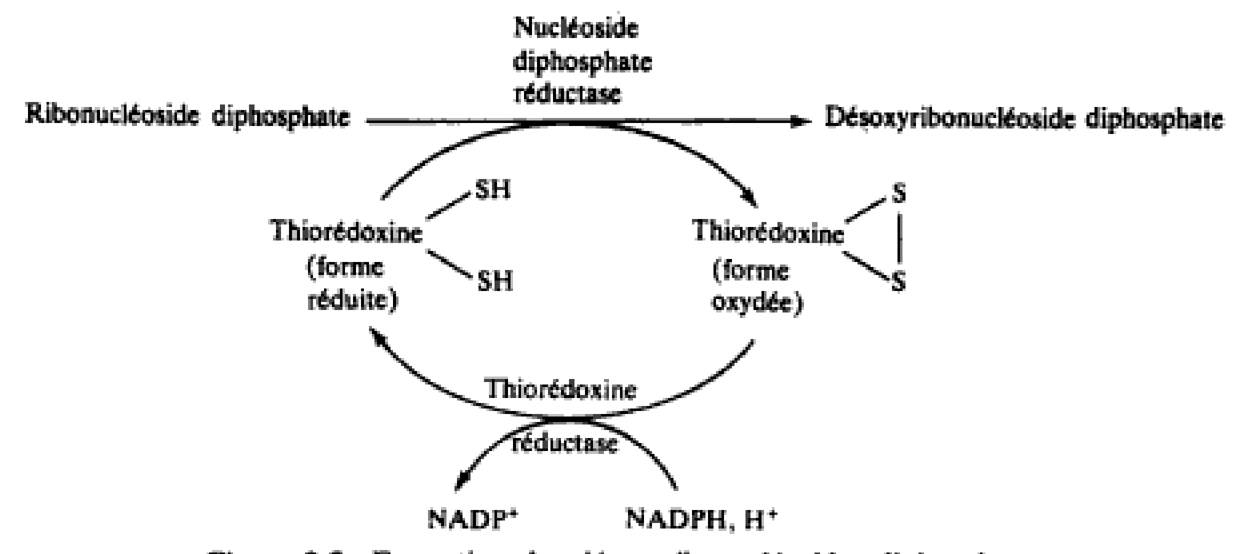


Figure 9.5 Formation des désoxyribonucléosides diphosphates.

La thiorédoxine oxydée est régénérée sous sa forme réduite au cours d'une réaction catalysée par la thiorédoxine réductase, le NADPH, H^+ étant le réducteur.

La biosynthèse du désoxythymidine-5'-phosphate (dTMP) est réalisée par méthylation du désoxyuridine-5'-phosphate (dUMP), le donneur de méthyle est le N^5, N^{10} méthylène tétrahydrofolate (N^5, N^{10} méthylène THF).

Acide folique

Acide tétrahydrofolique (THF)

N^5, N^{10}, méthylène tétrahydrofolate

Acide dihydrofolique (FH_2)

Figure 9.6 L'acide folique et ses dérivés.

Au cours de la réaction de méthylation du dUMP en dTMP, le N^5, N^{10} méthylène THF, après avoir cédé un groupement méthyle et deux hydrogènes apparaît sous forme de dihydrofolate (FH_2) ; le recyclage de ce produit en N^5, N^{10} méthylène THF se fait en deux étapes.

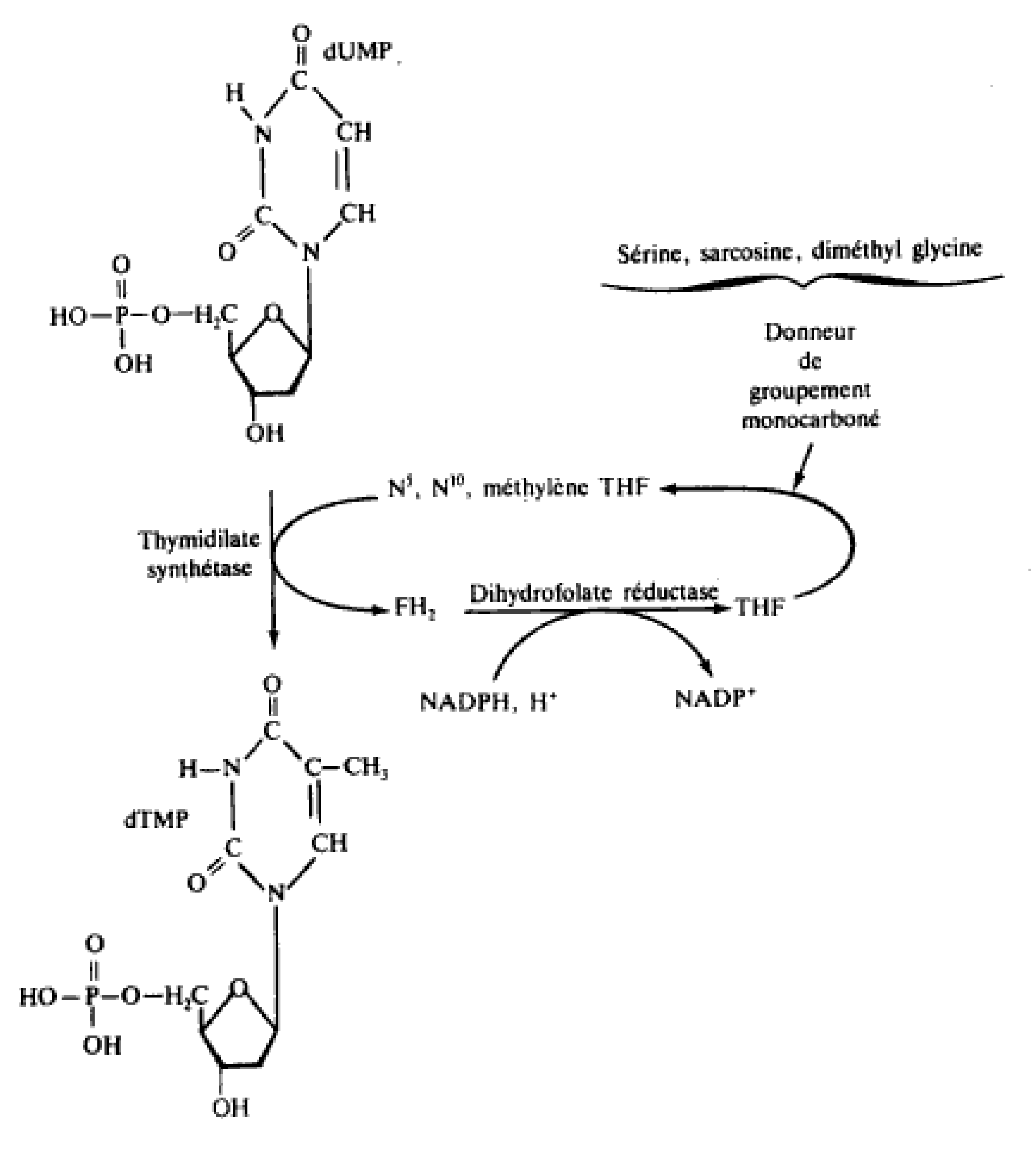


Figure 9.7 Amination du dUMP.

B. Biosynthèse des nucléotides puriques

Le point de départ de la biosynthèse des nucléotides puriques est le ribonucléotide de la glycinamide. Ce précurseur est synthétisé en deux étapes à partir du PRPP.

Sur ce composé viennent se fixer :

— deux résidus méthanoyl cédés par le N^5, N^{10} méthényl THF,

— un carboxyle par carboxylation directe,

— une molécule d'asparte suivie de l'élimination de fumarate (donc fixation d'un groupement aminé),

— un groupement aminé à partir de la glutamine.

Figure 9.8 Synthèse du ribonucléotide de la glycinamide.

Beaucoup de ces étapes nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP. Après cyclisation avec élimination d'eau, la synthèse aboutit à l'acide inosique (fig. 9.9) ou IMP.

Le passage aux autres nucléotides est résumé sur la figure 9.10.

Le mécanisme de réduction qui aboutit aux désoxyribonucléotides puriques est analogue à celui des nucléotides pyrimidiques.

II. LE CATABOLISME DES NUCLÉOTIDES

Pentoses et phosphate appartiennent à des métabolismes déjà étudiés, seule la destinée des bases sera envisagée ici.

A. Le catabolisme des bases pyrimidiques

Il est complexe et comporte la formation d'acides aminés. Les produits terminaux sont, chez l'homme, l'urée, l'ammoniac et le dioxyde de carbone.

B. Le catabolisme des bases puriques

Le catabolisme des bases puriques est localisé dans le tissu hépatique ; il comporte une désamination hydrolytique, non oxydative, suivie d'une oxydation par

Ribonucléotide du 4 carboxy-5-amino-imidazole

CO_2

Ribose-5-P

Formes tautomères du ribonucléotide du 5-amino-imidazole

ATP, Aspartate

ADP + P_i

Ribonucléotide du 4-N-succino-carboxyamide 5-amino-imidazole

ADP + P_i

ATP

Ribonucléotide de la N-formylglycinamidine

ADP + P_i, Glutamate

ATP + H_2O, Glutamine

Ribonucléotide de la N formylglycinamide

Fumarate

THF

N^5, N^{10} méthylène THF

Ribonucléotide de la glycinamide

Ribonucléotide du 4-carboxyamide 5-aminoimidazole

N^{10}-formyltétrahydrofolate

THF

Ribonucléotide du 4-carboxyamide 5-formylamino-imidazole

H_2O

Acide inosique IMP

Figure 9.9 Synthèse de l'acide inosique.

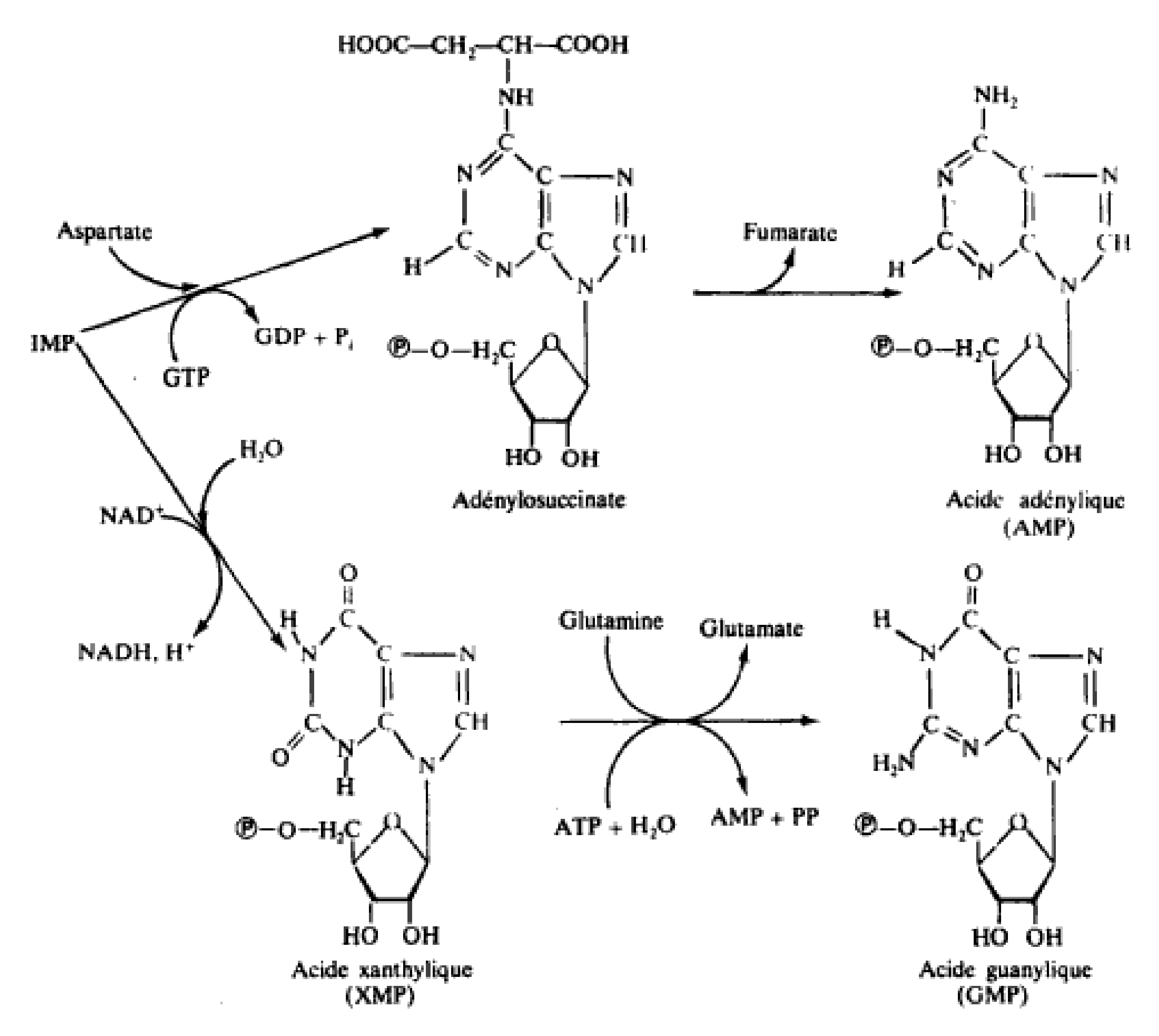


Figure 9.10 Biosynthèse des nucléosides-5'-phosphates puriques à partir de l'IMP.

la xanthine-oxydase dont le coenzyme est le FAD, et qui est abondante dans le foie, le rein et le lait (enzyme de Schardinger).

La dégradation s'arrête à ce stade chez l'homme et les singes supérieurs par suite de l'absence d'uricase. Par contre, chez les autres Mammifères, l'uricase provoque une décarboxylation oxydative avec ouverture du cycle pyrimidique, qui fournit de l'allantoïne dont la dégradation peut se poursuivre chez d'autres espèces animales jusqu'au stade d'urée (Batraciens, Poissons) ou d'ammoniac (Crustacés, Lamellibranches marins). L'ouverture du cycle sous l'action de l'uricase entraîne la disparition d'une bande d'absorption U.V. de l'acide urique et permet le dosage spectrophotométrique d'un substrat, ce qui est relativement rare.

Adénine

H_2O NH_3

Adénase

Hypoxanthine

$H_2O + O_2$

$1/2\ O_2 + H_2O$ ← Catalase — H_2O_2

Guanine

H_2O NH_3

Guanase

Xanthine

$H_2O + O_2$

Xanthine oxydase

$1/2\ O_2 + H_2O$ ← Catalase — H_2O_2

Acide urique (forme énolique) ⟷ Acide urique (forme cétonique)

Figure 9.11 Dégradation des purines chez l'homme.

10

Biosynthèse des acides nucléiques replication et transcription

A partir des résultats des recherches de **G. Mendel** publiés en 1866 sur la transmission des caractères héréditaires, les premières données complémentaires sur ce problème datent du début de ce siècle.

- *La théorie chromosomique de l'hérédité localise les gènes responsables de cette hérédité sur les chromosomes* dont la composition sera précisée beaucoup plus tard. La connaissance de la structure chimique des chromosomes : ADN et histones, ne permettait pas d'ailleurs de préciser quelle était la fraction, protéique ou nucléique qui constitue les gènes.
- Durant cette période *un lien étroit est établi entre l'hérédité,* en particulier celle des caractères chimiques, *et les protéines, plus précisément les enzymes.*

Depuis 1940, les progrès considérables des techniques d'analyse biochimique et l'utilisation des micro-organismes, essentiellement des bactéries, ont fait progresser rapidement les connaissances.

— *L'ADN est identifié au facteur transformant* responsable du caractère avirulent et de l'absence de capsule d'une souche de Pneumocoque ; ce qui est une preuve du *rôle fondamental de l'ADN dans la transmission des caractères héréditaires.* Il en est de même de l'étude du mécanisme de l'infection virale.

— L'analyse génétique et biochimique de mutants permet d'établir la preuve expérimentale directe que les gènes dirigent la synthèse des protéines et que la *structure propre à chaque protéine est déterminée par un gène spécifique* (colinéarité entre un gène et son produit, la protéine).

L'information que représente la structure protéique primaire ou séquence doit être contenue dans le gène, c'est-à-dire dans l'ADN le constituant. Elle est par ailleurs stable, donc permanente, et transmissible. Compte tenu de la structure des acides nucléiques et des résultats précédents, c'est dans la séquence nucléotidique de chacun d'entre eux qu'il faut rechercher cette information.

A. La replication de l'ADN

Pour que l'information demeure identique à elle-même au cours de la reproduction et de la multiplication cellulaires, il est indispensable que l'ADN synthétisé soit identique à l'ADN initialement présent.

1. LA RÉPLICATION EST DU TYPE SEMI-CONSERVATIF

Dans une expérience datant de 1958, Meselson et Stahl démontrent par l'utilisation d'éléments lourds que la propre reproduction de l'ADN ou réplication est du type semi-conservatif. Chaque brin d'un ADN bicaténaire dirige la synthèse du brin complémentaire identique à celui d'origine et demeure lié avec lui. La complémentarité des brins est une conséquence de la complémentarité des bases (A-T, G-C) qui entrent dans la composition des nucléotides.

Ces auteurs font pousser une souche d'E. coli sur un milieu minimum dans lequel l'unique source d'azote est l'ammonium $^{15}NH_4^+$, l'azote de cet ion est l'isotope lourd ^{15}N.

Après de nombreuses divisions, les colibacilles ont tous leurs composés azotés sous forme lourde, y compris l'ADN, la totalité des atomes d'azote est sous forme d'isotopes lourds ^{15}N.

L'ADN de ces bactéries est extrait et purifié, sa densité est comparée à celle de l'ADN des bactéries ayant cultivé sur milieu normal ($^{14}NH_4^+$) par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (fig. 10.1). L'ADN ^{15}N est appelé « ADN lourd », l'ADN ^{14}N « ADN léger ».

Les bactéries ayant cultivé sur $^{15}NH_4^+$ sont repiquées sur milieu minimum ordinaire $^{14}NH_4^+$, après une division (lorsque le nombre des bactéries a doublé), l'ADN des bactéries de la première génération est analysé selon la même technique.

Cet ADN a une densité intermédiaire entre l'ADN lourd et l'ADN léger, c'est l'ADN hydride qui est constitué d'un brin d'ADN ^{15}N et d'un brin d'ADN ^{14}N.

Après deux divisions, les auteurs obtiennent deux fractions, l'une est constituée d'ADN léger, l'autre d'ADN hybride.

2. L'ENZYME DE KORNBERG : ADN POLYMÉRASE 1

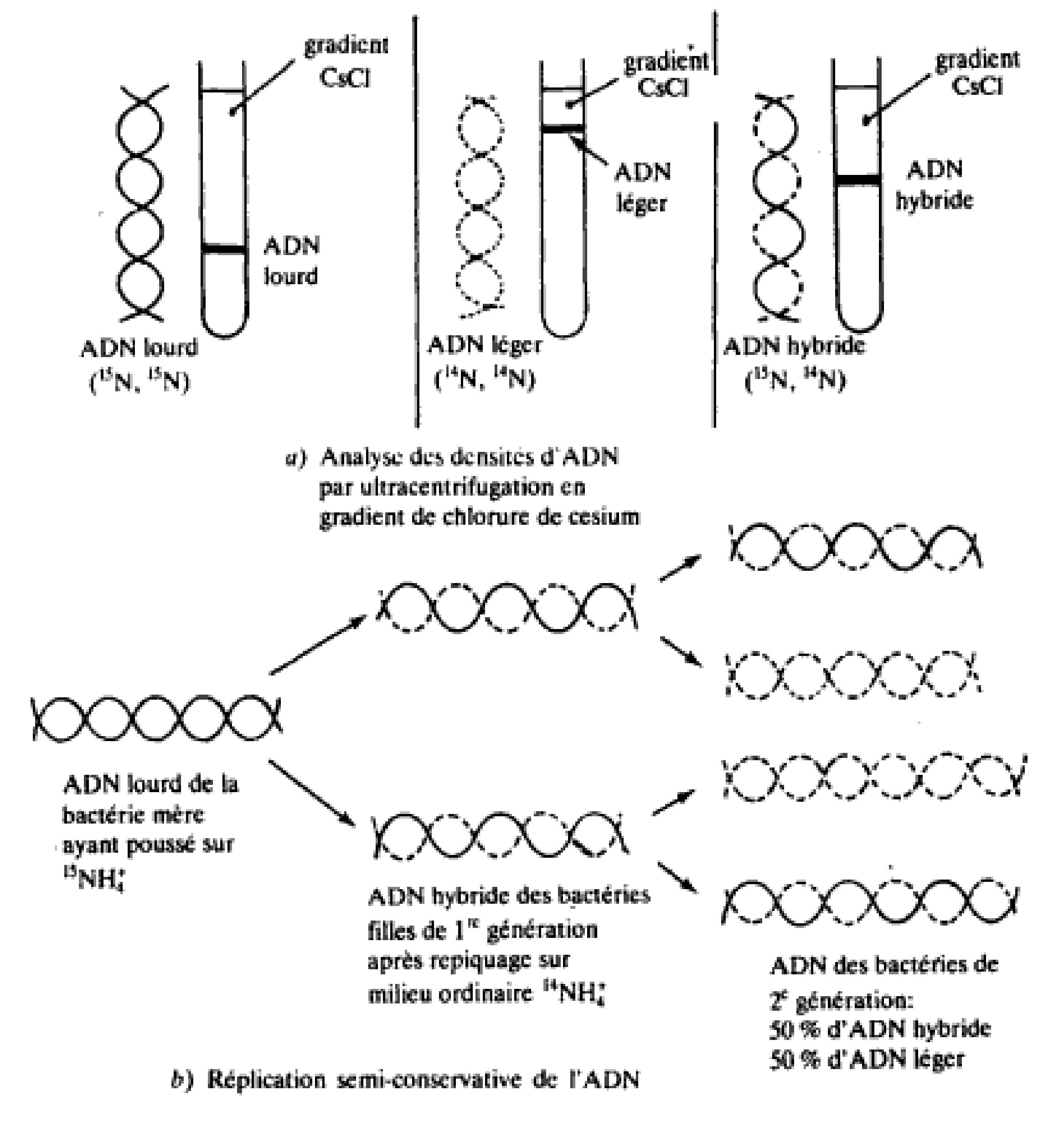
Le premier système de biosynthèse de l'ADN a été décrit en 1955 par Kornberg. L'ADN polymérase de E. coli (enzyme de Kornberg) incorpore des désoxyribonucléotides monophosphates sur l'extrémité en 3′ d'un ADN amorce selon le bilan suivant :

$$\text{ADN amorce} + \text{dXTP} \xrightarrow{\text{ADN polymérase 1}} \underset{\text{d'un nucléotide}}{\text{ADN allongé}} + \text{PP}$$

L'hydrolyse ultérieure du PP déplace l'équilibre de la réaction de la gauche vers la droite.

Le fonctionnement de cette enzyme exige : un ADN amorce, la présence des 4-désoxyribonucléosides triphosphates (ATP, GTP, CTP, TTP) et du magnésium (Mg^{2+}).

Le rôle de cette enzyme est de catalyser l'élongation d'une chaîne d'ADN dans le sens 5′ → 3′. Elle intervient dans les mécanismes de réparation des ADN, à cet égard il faut signaler deux propriétés importantes de cette enzyme :



a) Analyse des densités d'ADN par ultracentrifugation en gradient de chlorure de cesium

b) Réplication semi-conservative de l'ADN

Figure 10.1 Expérience de Meselson et Stahl.

- l'incorporation des désoxyribonucléotides est contrôlée uniquement par la complémentarité de la base azotée du nucléotide avec celle de l'autre brin qui sert de matrice ; la composition du brin néoformé est indépendante de la proportion des XTP présents dans le milieu réactionnel ; la synthèse cesse si l'un des XTP vient à manquer ;
- l'ADN polymérase I possède d'autres fonctions enzymatiques, elle a une activité nucléasique capable d'exciser des fragments de chaînes mal appariées.

3. L'ADN LIGASE

Les fragments d'ADN néoformés sont liés entre eux par une ADN ligase.

Cette enzyme catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre le —OH en 3′ de l'extrémité d'une chaîne d'ADN et le phosphate lié en 5′ à l'extrémité de l'autre chaîne, cette réaction nécessite de l'énergie.

L'enzyme est active sur un ADN deux brins, et est sans effet sur un ADN monocaténaire.

Ceci montre bien que les deux brins sont synthétisés dans le sens 5' → 3', par la même enzyme.

Cette synthèse commence en un site initiateur du duplex chromosomique, appelé réplicateur ; elle est bidirectionnelle, il existe deux fourches de réplication, chacune d'elles assure la synthèse du brin d'ADN complémentaire de chaque brin de la fourche (fig. 10.3).

Un modèle de réplication de l'ADN bactérien a été établi par Jacob et Brenner, il fait intervenir le mésosome et explique la séparation des chromosomes fils (consulter Microbiologie générale de H. Leclerc et coll., Doin Editeur, p. 102).

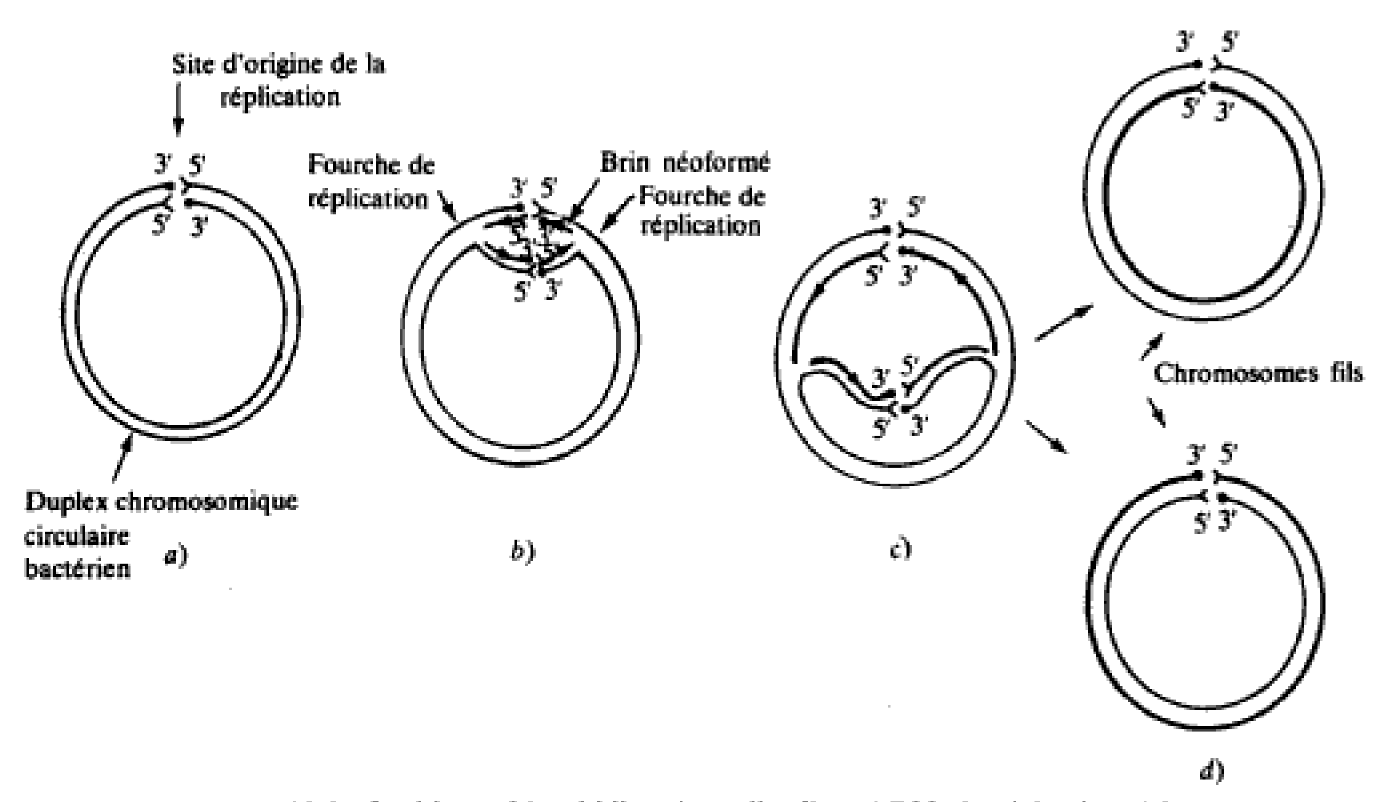


Figure 10.3 La biosynthèse bidirectionnelle d'un ADN circulaire bactérien.

a) le site d'origine de la réplication : le réplicateur,
b) le début de la réplication : les flèches sur les brins néoformés indiquent le sens de la synthèse,
c) forme théta (θ) qui a pu être observée sur les images d'autoradiographie réalisées par Cairns,
d) les deux fourches de réplication se rejoignent au pôle opposé du site d'origine.

En fin de réplication, l'ARN amorce est éliminé par excision, le vide qui en résulte est « réparé » par l'ADN polymérase I (fig. 10.4).

Remarque : chez les rétrovirus, il existe une enzyme, la transcriptase réverse, qui est capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire d'une matrice d'ARN, puis un ADN bicaténaire à partir de cet ADN monocaténaire.

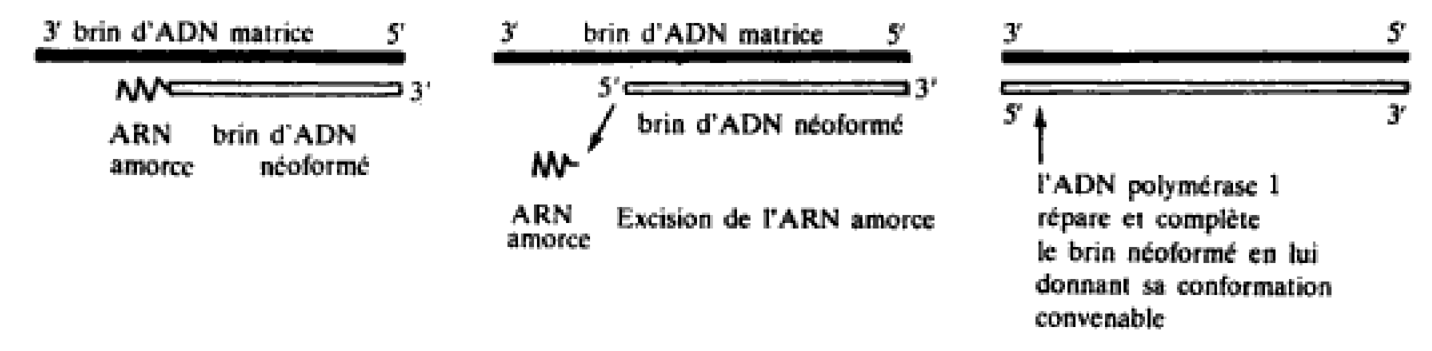


Figure 10.4 Elimination de l'amorce d'ARN.

B. La biosynthèse des ARN

1. LA SYNTHÈSE DES ARN : VUE D'ENSEMBLE

Les ARN cellulaires : ARN messager, ARN ribosomaux et ARN de transfert sont synthétisés dans la cellule, selon une structure complémentaire d'un ADN matrice, sous l'action d'une enzyme appelée ARN polymérase-ADN dépendante.

L'enzyme allonge les chaînes d'ARN en incorporant des nucléosides monophosphates (XMP), à partir des nucléosides triphosphates (XTP = ATP, GTP, UTP, CTP).

$$\underset{(n \text{ nucléotides})}{\text{ARN}} + \text{XTP} \xrightarrow[\text{ADN dépendante}]{\text{ARN polymérase}} \underset{[(n+1) \text{ nucléotides}]}{\text{ARN}} + \text{PP}$$

Comme l'ADN polymérase I, l'ARN polymérase exige du Mg^{2+}. Le bilan de l'incorporation d'un nucléoside monophosphate présente certaines similitudes avec la réaction catalysée par l'ADN polymérase, mais il existe un nombre notable de différences.

Les caractéristiques de cette synthèse peuvent se résumer de la façon suivante :

- L'enzyme ne requiert pas d'amorce.
- Chez E. coli, la même ARN polymérase-ADN dépendante catalyse la biosynthèse des trois types d'ARN, chez les eucaryotes, leur biosynthèse est catalysée par des ARN polymérases différentes.
- Un ADN bicaténaire sert de matrice, mais un seul des brins est copié.
- La croissance de la chaîne d'ARN se fait dans le sens $5' \rightarrow 3'$.
- Les ARN synthétisés subissent généralement une modification de structure (maturation) postérieure à leur synthèse. Les ARN de transfert et les ARN ribosomaux proviennent d'ARN primaires qui subissent pour atteindre leur structure définitive, des coupures, des additions de nucléotides, des méthylations (du ribose en 2' des ARNr des eucaryotes, de bases des ARNr bactériens). L'ARNm bactérien ne subit pas de maturation, en revanche chez les eucaryotes l'ARNm primaire subit une modification appelée épissage.

La **transcription** définit, dans l'expression de l'information génétique de l'ADN, la biosynthèse de l'ARNm.

2. LA TRANSCRIPTION

Il est apparu assez rapidement que le transfert d'information (séquence des nucléotides de l'ADN → séquence des amino-acides des protéines) ne se faisait pas directement de l'ADN à la protéine. En particulier, il est indispensable qu'un système d'amplification existe entre les deux pour assurer une synthèse rapide.

L'intermédiaire est l'ARN messager, dont l'existence a d'abord été prévue théoriquement puis mise en évidence dans les cellules.

Les ARNm représentent environ 5 % de l'ARN total ; leur durée de vie est brève, ils sont métaboliquement instables, surtout chez les bactéries. Les organismes plus évolués possèdent des ARNm plus stables, au moins dans la majeure partie de leur vie. Ils sont monocaténaires, et complémentaires d'une zone d'ADN de la même espèce, il est possible d'obtenir des hybrides ADN-ARNm.

Les gènes de structure ou cistrons qui dirigent la synthèse des chaînes polypeptidiques de plusieurs enzymes catalysant les étapes de la biosynthèse ou de la dégradation d'un métabolite font en général partie du même opéron. Ces gènes de structure qui représentent plus de 90 % de l'ADN bactérien sont transcrits généralement en une seule fois pour un opéron donné.

Dans le cas plus rare, d'une transcription monocistronique, le messager correspond alors à un seul cistron.

— *La transcription d'un opéron ou d'un cistron* suppose : un début ou initiation, un développement de la chaîne ou élongation, une fin ou terminaison ; il faut donc une ponctuation sur l'ADN et un système de reconnaissance pour les enzymes.

- **L'initiation**

L'ARN polymérase est oligomérique ; l'enzyme minimum, appelée « noyau », est constituée de quatre sous-unités ($\alpha_2 \beta \beta'$) auxquelles est associée une sous-unité sigma (σ), utilisée seulement pour l'initiation ; après l'initiation, le facteur σ se dissocie du noyau.

La sous-unité σ est impliquée dans la reconnaissance de la séquence spécifique de la transcription, sur l'ADN matrice, appelée **promoteur.**

L'enzyme complète (noyau tétramérique + sous-unité σ) est donc responsable de l'initiation de la transcription.

Les mécanismes moléculaires de la régulation de la transcription de l'opéron lactose chez E. coli expliquent le rôle du site d'initiation.

Le colibacille cultivé sur milieu dépourvu de lactose, ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire à son métabolisme.

Le lactose est inducteur de l'opéron lactose.

Cet opéron est constitué de trois gènes de structure : *Z*, *Y* et *A* (*Z* = gène de structure de la β-galactosidase, *Y* = gène de structure de la β-galactoside perméase, *A* = gène de structure de la β-galactoside acétylase), d'un gène régulateur : le gène *i*

et de deux sites de contrôle de l'initiation de la transcription : le promoteur et l'opérateur (fig. 10.5).

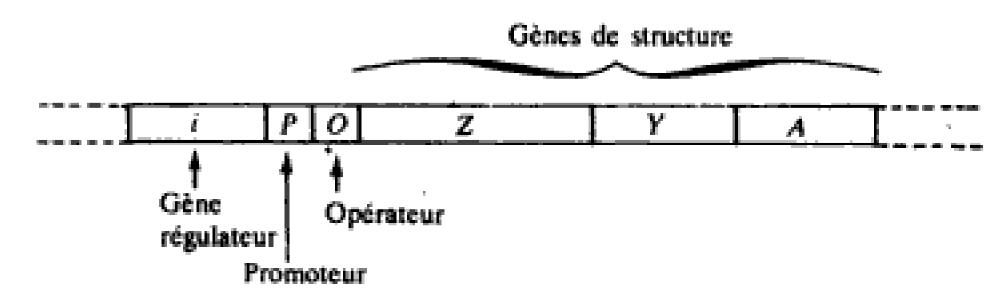


Figure 10.5 L'opéron lactose.

Le gène régulateur *i* est constitutivement transcrit en un ARNm, lequel est aussitôt traduit en une protéine tétramérique appelée répresseur.

Site opérateur et répresseur sont complémentaires et s'associent en un complexe réversible.

L'ARN polymérase complète (noyau tétramérique + facteur σ) se fixe sur le promoteur, mais la transcription des gènes *Z*, *Y* et *A* est impossible tant que l'opérateur est encombré stériquement par le répresseur ; l'opérateur est situé entre le promoteur et les gènes *Z*, *Y* et *A* (fig. 10.6) ; la transcription est réprimée. La présence d'un inducteur β-galactosidique [lactose ou IPTG (isopropyl thio β-galactoside)] va induire la transcription polycistronique des gènes de structure de l'opéron lactose en libérant le site opérateur. Les β-galactosides forment avec le répresseur un complexe répresseur-inducteur, inactif, incapable de se fixer sur l'opérateur ; l'ARN polymérase-ADN dépendante va pouvoir copier l'un des brins des séquences d'ADN concernées.

La transcription des gènes *Z*, *Y* et *A* a lieu, un ARNm polycistronique est synthétisé, sa traduction aboutit à la synthèse des enzymes nécessaires à la perméation et au métabolisme des β-D galactosides (β-galactosidase, β-galactoside perméase, et β-galactoside acétylase).

Remarques :

— Le lactose du milieu de culture pénètre faiblement, sans perméase dans la bactérie avant induction, sa concentration intracellulaire est très faible mais suffisante pour induire l'opéron lactose.

— L'AMP cyclique stimule l'initiation de la transcription de l'opéron lactose. L'AMPc forme avec le CAP (protéine activatrice de gène) un complexe qui favorise la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur.

— Les chaînes d'ARN commencent par un nucléoside purique triphosphate lié en 5'.

Aussitôt la transcription commencée, l'enzyme complète se dissocie en son noyau $\alpha_2 \beta \beta'$ qui va assurer l'élongation et en son facteur σ. La sous-unité σ libérée pourra alors réactiver un autre noyau, de façon à réinitier une autre transcription.

Le noyau ($\alpha_2 \beta \beta'$) de l'ARN polymérase se déplace sur le brin matrice dans le sens 3' → 5' et synthétise au fur et à mesure qu'il progresse un ARNm, monocaténaire et antiparallèle, dans le sens 5' → 3'.

La progression du noyau d'ARN polymérase est accompagnée d'un déroulement du duplex d'ADN, suivi d'un réenroulement postérieur à la transcription.

Il est vraisemblable que cette activité de déroulement-enroulement est contrôlée par l'ARN polymérase elle-même.

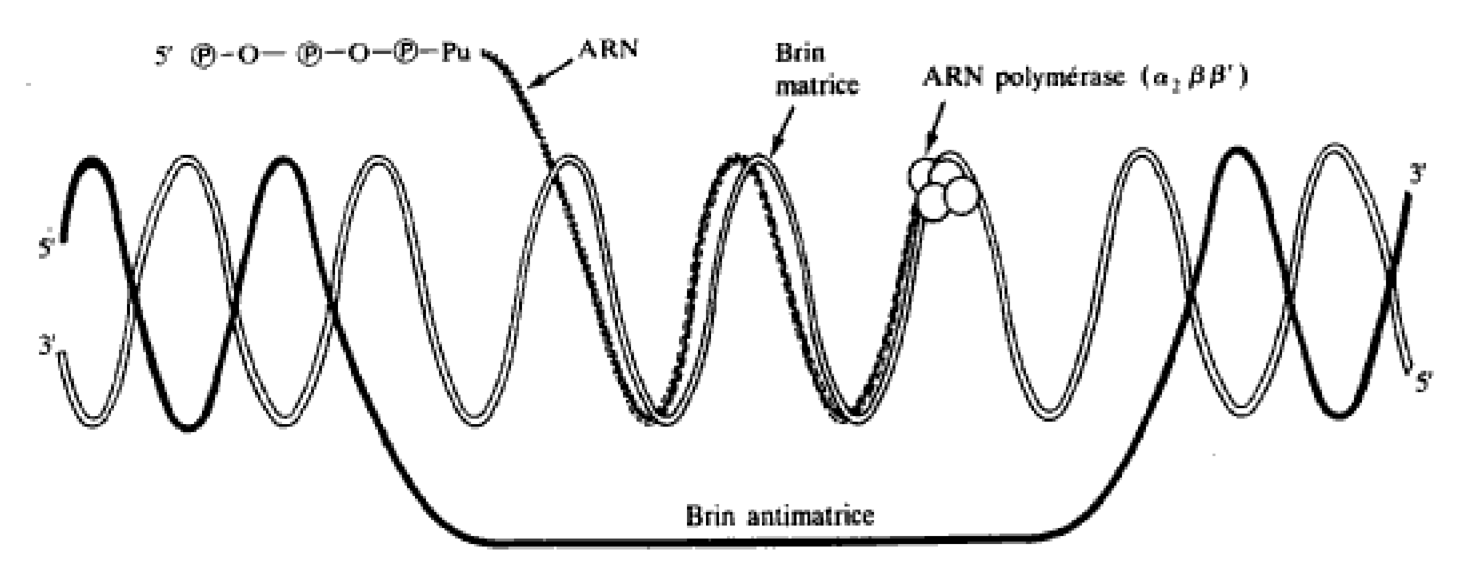


Figure 10.7 Transcription : l'ARN polymérase copie un brin d'ADN.

- **La terminaison**

Le mécanisme de la terminaison de la transcription est déclenché par une séquence particulière de l'ADN et sous la dépendance d'un autre facteur appelé protéine rho (ρ).

La terminaison de la transcription d'un opéron est contrôlée par un site de terminaison obligeant l'ARN-polymérase à s'arrêter, puis à se dissocier du complexe [ADN-matrice, ARN-formé, ARN-polymérase].

La protéine rho est nécessaire pour certains sites de terminaison, elle permet alors la libération de l'ARNm formé.

11

La synthèse protéique, la traduction

La phase finale du transfert de l'information contenue dans l'ADN est la synthèse protéique ; dans le chapitre précédent, la description de la **transcription** a permis d'expliquer comment l'information contenue dans l'ADN sous forme d'une séquence de nucléotides était transformée en une séquence de nucléotides d'un ARN messager. Dans ce chapitre consacré à la synthèse protéique, on appellera **traduction** l'ensemble des processus qui assurent le transfert de l'information contenue dans l'ARNm vers une séquence d'acides aminés dans une protéine.

La colinéarité, démontrée chez les bactéries, est la correspondance qui existe entre la séquence des bases de l'ARN messager et celle des acides aminés dans la chaîne peptidique : ces deux macromolécules présentent une structure linéaire non branchée, l'ordre dans lequel les acides aminés sont liés est imposé par celui des nucléotides de l'ARN.

En quelle langue ces signaux sont-ils transmis et interprétés ?

C'est le **code génétique** ou code de lecture de l'ARNm qui assure la correspondance entre les structures primaires de l'ARNm et de la protéine.

La machinerie cellulaire qui assure la synthèse protéique (fig. 11.1) est

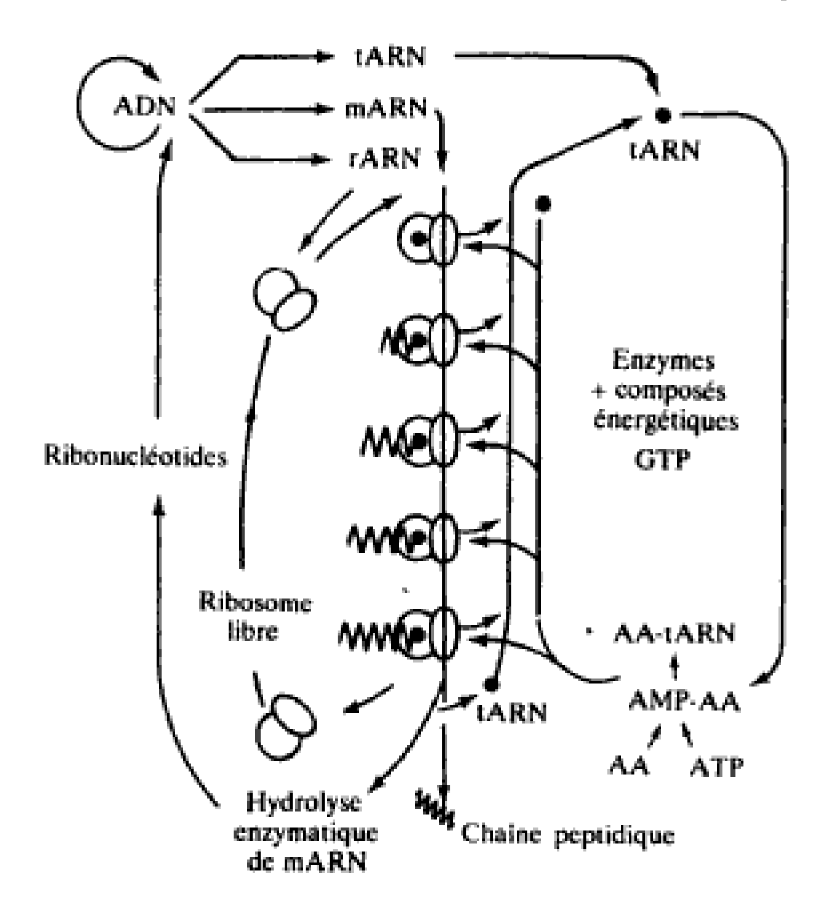


Figure 11.1 Schéma de la synthèse protéique (d'après Watson).

complexe, les protéines sont synthétisées sur les ribosomes : organites cellulaires de 20 nm de longueur, formés de deux sous-unités et constitués d'acides ribonucléiques et de protéines.

Le ribosome s'associe à l'ARNm, se déplace le long du brin en le décryptant tandis que la chaîne peptidique s'allonge, le complexe se dissocie lorsque la synthèse est terminée.

Plusieurs ribosomes s'attachent à l'ARNm et forment le polysome, ce qui amplifie la synthèse, en multipliant les sites qui sont à l'origine des molécules protéiques. Pour être incorporés, les acides aminés sont conduits au complexe ribosome-ARNm par des ARN de transfert ou ARNt qui représentent environ 10 % de l'ARN total et qui présentent une double spécificité :

— spécificité pour l'aminoacide transféré

— spécificité pour le segment d'ARNm reconnu, chaque ARNt reconnaît de façon très précise des signaux portés par l'ARNm.

I. LE CODE GÉNÉTIQUE

Le déchiffrage du code de lecture de l'ARN messager a été fait grâce à des recherches basées sur la notion de colinéarité gène-protéine évoquée antérieurement et grâce également à l'utilisation de polyribonucléotides de synthèse.

— **Le code génétique est à trois lettres.** Sur la molécule d'ARN messager, des successions de trois nucléotides appelées **codons** ou **triplets** représentent les signaux identifiés par les ARN de transfert, qui renferment dans leurs molécules, en position exposée favorablement, trois nucléotides complémentaires constituant l'anti-codon spécifique (fig. 11.2).

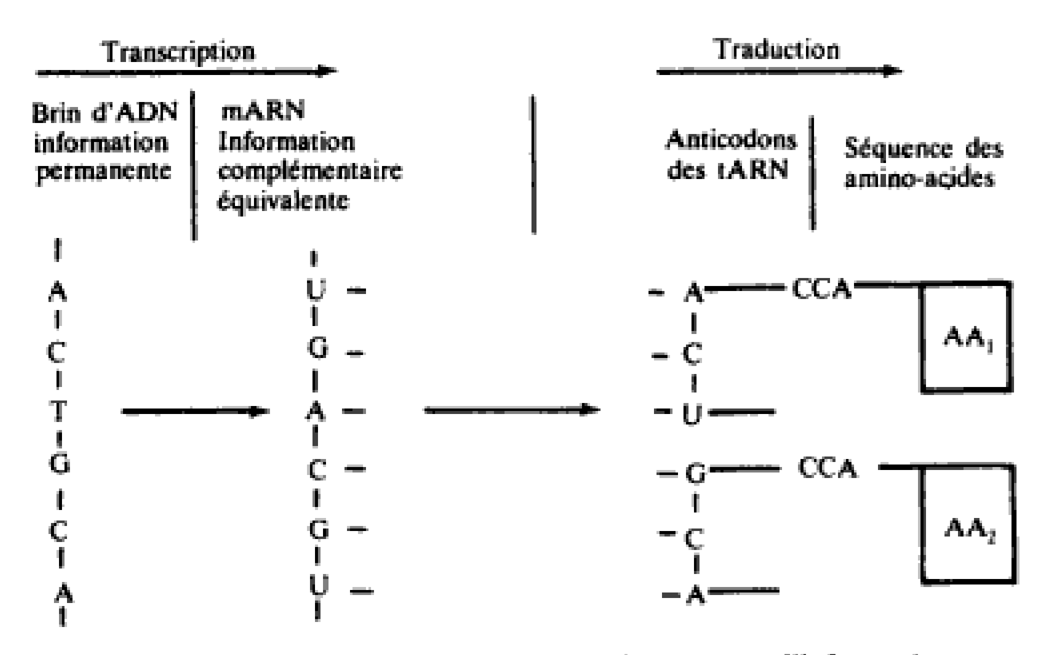


Figure 11.2 Principe de transmission du contenu d'information.

Le **code est dégénéré** puisque plusieurs triplets déterminent le même acide aminé, mais aucun codon ne définit plusieurs acides aminés.

La leucine et l'arginine sont codés par six triplets, six acides aminés sont codés chacun par quatre triplets dont les deux premières lettres sont identiques : les codons qui commencent

— par CC déterminent la proline
— par CU déterminent la leucine
— par UC déterminent la sérine
— par GU déterminent la valine
— par AC déterminent la thréonine
— par GC déterminent l'alanine

Les autres acides aminés sont déterminés par trois, deux ou un codons. Enfin, il existe trois codons non-sens qui représentent des signaux de terminaison de chaînes.

Le **code n'est pas chevauchant.** Un acide aminé peut être suivi par n'importe lequel des autres acides aminés dans une chaîne polypeptidique.

Selon l'hypothèse d'une lecture chevauchante de l'ARNm, un acide aminé ne pourrait pas être suivi de n'importe quel autre acide aminé ; par exemple, la séquence AUUCGA permettrait de déterminer une séquence de quatre acides aminés, ceux qui sont codés par les triplets AUU, UUC, UCG, CGA.

En revanche, la lecture non chevauchante de cette même séquence ne détermine que deux acides aminés, ceux codés par les triplets AUU et CGA.

II. LES ÉLÉMENTS DU SYSTÈME TRADUCTEUR

Le polysome représente le site de biosynthèse des protéines, c'est un complexe formé par l'association d'une molécule d'ARNm, de plusieurs ribosomes, auxquels les ARNt se lient transitoirement et qui supporte la chaîne peptidique en voie de croissance.

Cette machinerie complexe fait intervenir de nombreuses molécules : acides nucléiques et enzymes, isolées ou organisées en systèmes multiples.

1. LE RIBOSOME

La structure du ribosome est voisine chez les bactéries et les eucaryotes.

Chez les bactéries, il se présente sous forme d'une particule de 20 nm de long, de masse moléculaire 2,7 mégadaltons, de constante de sédimentation 70 S ; il est constitué de deux sous-unités, l'une de masse moléculaire 1,8 mégadalton et de constante de sédimentation 50 S, l'autre de masse moléculaire 0,9 mégadalton et de constante de sédimentation 30 S.

Chacune des particules est formée d'ARNr et de protéines, la sous-unité 50 S renferme deux ARNr (un ARN 5 S et un ARN 16 S) et 34 protéines ; la sous-unité 30 S est composée d'un ARN 16 S et de 21 protéines.

Dans les cellules eucaryotes, le ribosome de constante de sédimentation 80 S est constitué de deux sous-unités, l'une de constante de sédimentation 40 S, l'autre de constante de sédimentation 60 S.

La fonction du ribosome dans la synthèse protéique est double :

— assurer le positionnement du complexe acyl-ARNt sur l'ARN messager ;
— effectuer la synthèse de la liaison peptidique.

La dissociation des ribosomes en sous-unités est réalisée in vitro, on a démontré, à l'aide d'expériences utilisant des ribosomes marqués, que cette dissociation se produit également in vivo, au cours de la synthèse protéique.

2. LES ARN DE TRANSFERT

Ces acides nucléiques de faible masse moléculaire (environ 25 kilodaltons) vont incorporer les acides aminés dans la chaîne peptidique et y assurer leur position correcte en décodant les signaux portés par l'ARN messager.

Dans les cellules, il existe une soixantaine d'ARNt ; pour chaque acide aminé, il existe au moins un ARNt **spécifique,** ce qui implique évidemment qu'il peut exister plusieurs ARNt spécifiques d'un même acide aminé.

Il existe une grande parenté de structure entre les différents ARNt rencontrés dans le monde vivant (fig. 11.4) :

— leur chaîne comporte environ 80 nucléotides assemblés en un brin monocaténaire dans lequel des bases anormales sont fortement représentées (de l'ordre de 10 %) : bases méthylées, hydrogénées, ou isomères géométriques ;

— la chaîne est repliée en « feuille de trèfle » ; certaines parties du brin sont torsadées en double hélice, d'autres, au contraire, sont déployées en boucles. Les bases anormales pourraient expliquer l'organisation de ces boucles, par leur inaptitude à s'apparier avec une autre base. La première boucle s'appelle pseudo U, car elle contient une pseudo-uridine, la seconde s'appelle boucle variable ou « doigt », la troisième est celle de l'anticodon, la quatrième est appelée diHU, car elle contient, en général, deux dihydro-uridines ;

— l'extrémité 3' comporte une séquence nucléotidique commune à tous les ARNt, qui représente le point de fixation de l'acide aminé (fig. 11.4) ;

— il existe, de surcroît, une structure tertiaire des ARNt, la feuille de trèfle se replie sur elle-même en forme d'équerre.

3. LES ENZYMES

Plus de trente enzymes interviennent à différentes étapes de la traduction de l'ARNm en protéines.

Parmi elles, vingt enzymes différentes catalysent la réaction de charge des acides aminés sur leurs ARNt, ce sont les aminoacyl-ARNt synthétases qui reconnaissent à chaque fois l'acide aminé et son (ou ses) ARNt.

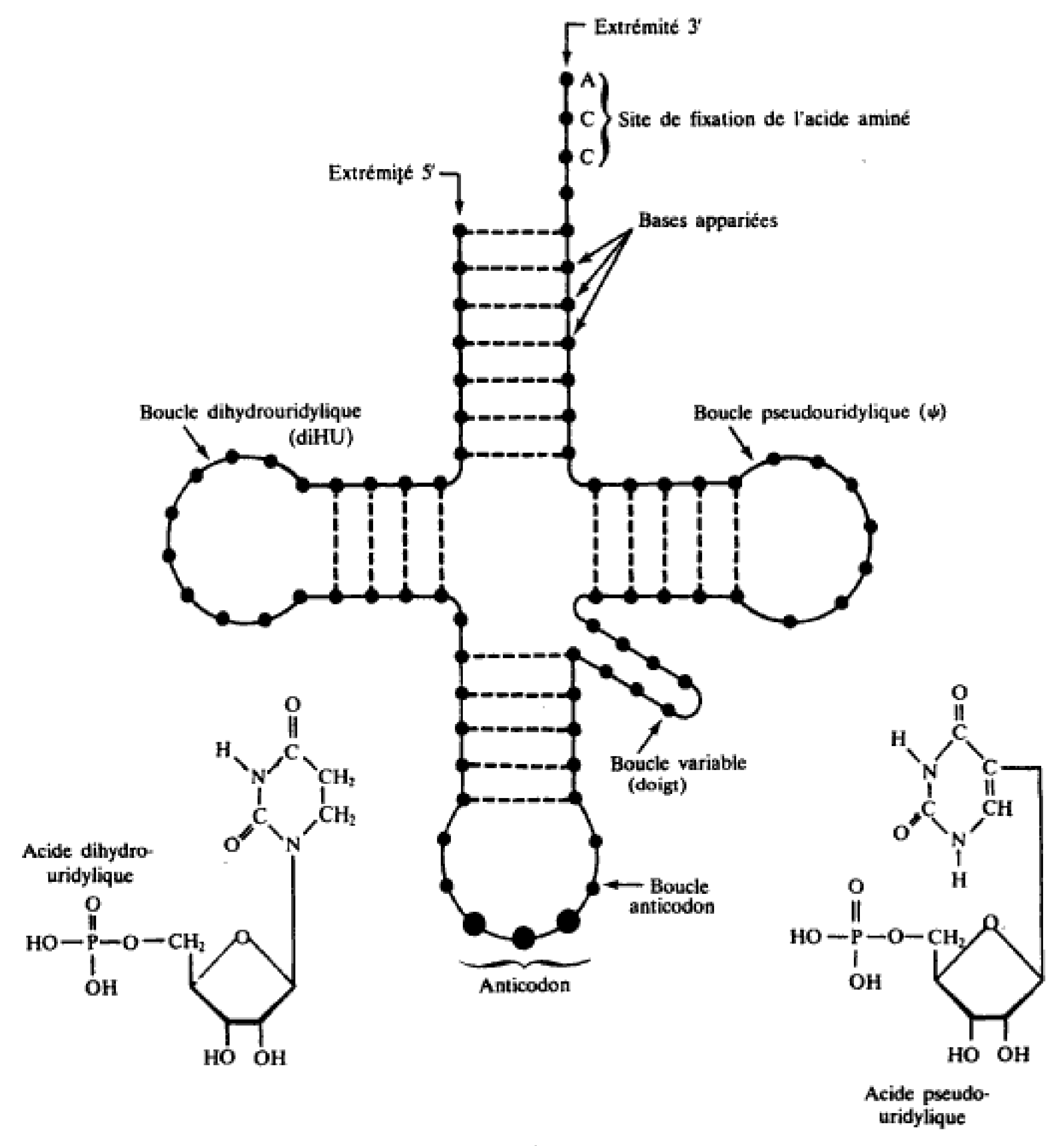


Figure 11.4 Structure d'un ARN de transfert.

Il existe, en outre, une dizaine d'enzymes qui interviennent lors de la synthèse de la chaîne peptidique au niveau du polysome.

III. FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME TRADUCTEUR

La biosynthèse d'une chaîne polypeptidique est polarisée, elle s'effectue dans le sens acide aminé N terminal vers acide aminé C terminal, tandis que la traduction de l'ARNm se fait dans le sens $5' \rightarrow 3'$.

Cette synthèse est très rapide, des mesures faites chez les bactéries ont permis d'établir des durées qui vont de quelques dizaines de secondes à quelques minutes.

Quatre phases fondamentales rendent compte clairement du processus :

— l'activation des acides aminés ;
— l'initiation de la biosynthèse ;
— l'élongation de la chaîne ;
— la terminaison.

1. ACTIVATION ET FORMATION DES AMINOACYL-ARNt

L'aminoacyl-ARNt est le précurseur de la biosynthèse, outre l'acide aminé qu'il incorpore dans la chaîne peptidique, il représente une forme activée, la liaison entre l'acide aminé et l'ARNt étant une liaison « riche en énergie ».

L'enzyme, l'aminoacyl-ARNt synthétase, catalyse une réaction dont le bilan peut s'écrire :

$$\text{acide aminé} + \text{ARNt} \xrightarrow[\text{ATP} \;\curvearrowright\; \text{AMP} + \text{PP}]{\text{E = aminoacyl - ARNt synthétase}} \text{aminoacyl - ARNt}$$

Le mécanisme de cette réaction est le suivant :

— en présence d'ATP, l'enzyme active le groupement carboxyle de l'acide aminé en formant une liaison anhydride mixte, à haut potentiel d'énergie, avec l'AMP ; l'acide aminé activé reste lié à l'enzyme

$$\text{R—CH(NH}_2\text{)—COOH} + \text{E} \xrightarrow[\text{ATP} \;\curvearrowright\; \text{PP}]{} \left[\text{R—CH(NH}_2\text{)—C(=O)—O}\sim\text{Ⓟ-Adénosine}\right]\text{E}$$

— Dans une deuxième étape, l'enzyme déplace le groupement aminoacyle de son complexe avec l'AMP et le transfère sur l'extrémité CCA de l'ARNt qui lui est spécifique.

$$\left[R-CH(NH_2)-C(=O)-O \sim \text{Ⓟ}-\text{Adénosine} \right] E + ARNt \longrightarrow \text{aminoacyl-ARNt} + E + AMP$$

L'aminoacyl-ARNt synthétase présente une double spécificité, pour l'acide animé et pour chacun des ARNt qui lui correspondent.

2. INITIATION DE LA TRADUCTION

La lecture d'un ARN messager bactérien commence au niveau d'un signal, situé à l'extrémité 5', qui est le codon AUG de la méthionine et de la N-formyl-méthionine.

$$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH-C(=O)H)-C(=O)-OH$$

← groupement formyle

N formyl-méthionine

Dans toutes les protéines, le premier acide aminé incorporé est la N-formyl-méthionine ; aussitôt après, cet acide aminé est déformylé, et pour la plupart des chaînes peptidiques la méthionine N terminale est hydrolysée. Malgré tout, la méthionine est l'acide aminé le plus souvent présent en position N terminale.

Il existe pour la méthionine deux ARNt, possédant le même anticodon UAC, seul l'un d'eux peut être N-formylé sous forme de méthionyl-ARNt ; il sert à l'initiation, le groupement-NH_2 étant bloqué, cet acide aminé ne peut être incorporé en cours d'élongation de chaîne, l'autre sert à cet effet.

L'initiation commence par l'association de la sous-unité 30 S du ribosome (fig. 11.5) et l'extrémité 5' de l'ARNm.

Le N-formyl-méthionyl-ARNt se met ensuite en place sur le codon initiateur de l'ARN messager.

Enfin une sous-unité 50 S s'associe au complexe ainsi formé, reconstituant le ribosome fonctionnel et entier. La sous-unité 50 S possède deux sites de fixation d'ARNt, l'un s'appelle le site P, l'autre le site A, le N-formyl-méthionyl-ARNt occupe le site P.

Les différentes molécules qui composent le ribosome ont pour fonction de reconnaître les différents partenaires de cette association et d'assurer la stabilité de l'ensemble. Trois protéines, appelées facteurs d'initiation : IF_1, IF_2 et IF_3 (*) sont également indispensables à ce début de synthèse.

(*) IF = Initiation Factor.

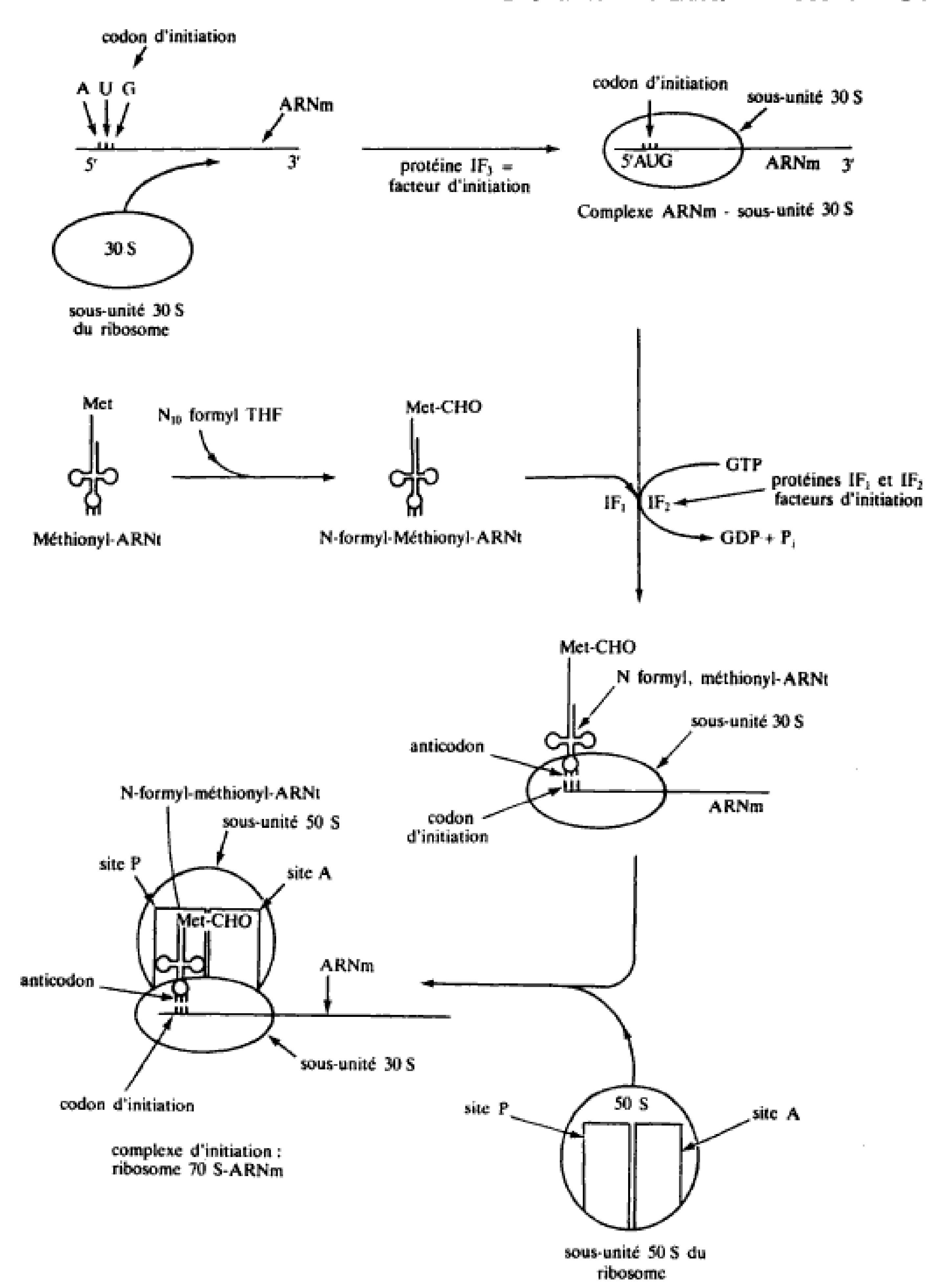


Figure 11.5 Mécanisme d'initiation de la traduction.

3. ÉLONGATION DES CHAÎNES

Le complexe d'initiation étant formé, la N-formyl-méthionine, acide aminé N terminal, est en place positionnée par la liaison codon (AUG)-anticodon (UAC) du N-formyl-méthionyl-ARNt ; la première liaison peptidique va être formée entre le carboxyle de la méthionine et le groupement aminé de l'acide aminé de rang 2 (fig. 11.6), puis une deuxième liaison peptidique sera créée entre le carboxyle de l'acide aminé de rang 2 et le groupement aminé de rang 3. Ce processus va se perpétrer jusqu'à ce qu'un signal de terminaison soit décrypté sur l'ARN messager.

Les modalités de la formation d'une liaison peptidique sont invariantes ; en analysant la séquence des événements qui correspondent à l'incorporation de l'acide aminé de rang n dans la chaîne peptidique, on a :

• le site P occupé par l'ARNt spécifique de l'acide aminé de rang $(n-1)$, portant la chaîne peptidique en voie de croissance. Cette chaîne peptidique formée des acides aminés de rang 1 à $(n-1)$ est liée par le carboxyle de l'acide aminé $(n-1)$ à l'ARNt (fig. 11.7*a*) ;

• l'aminoacyl-ARNt qui correspond à l'acide aminé de rang n entre dans le ribosome, occupe le site A, positionné par la liaison codon (de l'ARNm)-anticodon (de l'ARNt). Cette étape consomme un GTP et nécessite les facteurs d'élongation EF-TU et EF-TS (**) (fig. 11.7*b*) ;

• aussitôt après, une enzyme, appelée peptidyl transférase, catalyse la formation de la liaison peptidique et transfère la chaîne polypeptidique commençant par l'acide aminé de rang 1 et se terminant par l'acide aminé de rang $(n-1)$ sur le groupement aminé de l'acide aminé de rang n (fig. 11.7*c*). Cette enzyme est l'une des protéines constituant la sous-unité 50 S. A ce stade, le polypeptide composé de n acides aminés est lié à l'ARNt de l'acide aminé de rang n et occupe le site A ;

• pour que l'élongation puisse continuer, il y a translocation : le polypeptidyl-ARNt est déplacé du site A dans le site P, tandis que l'ARNm est lui-même déplacé de telle sorte que le codon traduit reste lié à l'anticodon, face au site P (fig. 11.7*d*), l'ARNm suit l'ARNt dans son déplacement, est entraîné par lui. Cette étape consomme un GTP et nécessite un facteur d'élongation : EF-G. Au cours de la translocation l'ARNt libre qui occupait antérieurement le site P en est chassé ;

• après la translocation, le site A devenu vacant pourra recevoir l'aminoacyl-ARNt de rang $(n+1)$.

Remarque : La même molécule d'ARNm peut être traduite simultanément par plusieurs ribosomes.

(**) EF = Elongation Factor.

Figure 11.6 Réaction de synthèse de la première liaison peptidique.

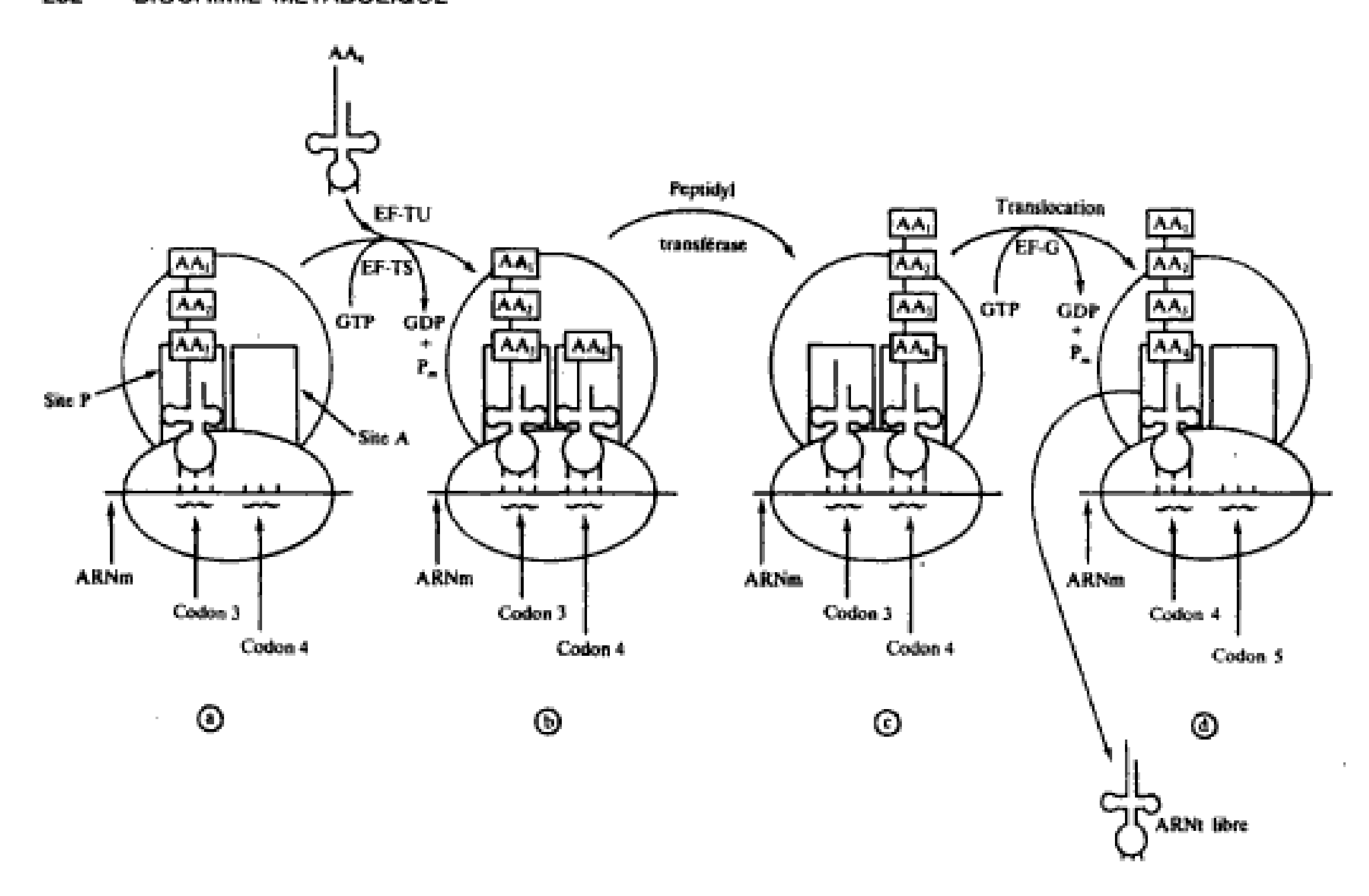


Figure 11.7 Modalités de l'incorporation d'un acide aminé dans une chaîne peptidique.

a) Le site P est occupé par le peptidyl-ARNt, le site A est vacant.

b) L'aminoacyl$_4$-ARNt occupe le site A, un GTP est consommé, deux facteurs d'élongation requis (EF TU et EF TS).

c) Synthèse de la liaison peptidique, catalysé par la peptidyl transférase.

d) Translocation, un GTP est consommé, un facteur d'élongation requis : EF-G.

4. TERMINAISON DE LA TRADUCTION

L'arrêt de la synthèse d'une protéine est provoqué par une ponctuation écrite sur l'ARNm, un signal d'arrêt constitué par l'un des trois codons non-sens : ocre (UAA), ambre (UAG) et azur (UGA) (fig. 11.2).

La présence d'un codon non-sens provoque la libération de la chaîne polypeptidique néosynthétisée, ainsi que la dissociation du complexe ARNm-ribosome.

Cette étape nécessite la présence de deux protéines appelées facteurs de terminaison : RF (*) qui décryptent les signaux de terminaison précités ; chez E. coli, RF_1 lit les codons UAG et UAA, RF_2 lit les codons UGA et UAA.

La traduction des ARNm polycistroniques fait intervenir au cours de leur traduction, un signal d'initiation et un signal de terminaison pour la synthèse de chacune des chaînes.

(*) RF = release factor = facteur de relâchement.

5. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA STRUCTURE DES PROTÉINES

De nombreuses protéines subissent des modifications afin d'acquérir leur structure définitive :

* Toutes sont déformylées, le groupement d'atomes —CHO porté par l'azote N terminal de la méthionine est éliminé par hydrolyse.
* Pour de nombreuses protéines, la méthionine N terminale est elle aussi hydrolysée sous l'influence d'une amino-peptidase.
* Des coupures de fragments plus importants peuvent intervenir induisant un changement de conformation qui rend la protéine active.
* Formation de ponts disulfure.
* Phosphorylation de fonctions hydroxyles portées par les chaînes latérales d'acides aminés alcools.
* Combinaison avec des oses pour former des glycoprotéines.
* Hydroxylation de résidus d'acides aminés (proline et lysine).
* Etablissement de liaisons covalentes avec des groupements prosthétiques (exemple : la biotine).

IV. LA RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Il existe dans les cellules, des **enzymes constitutives** qui sont synthétisées jusqu'à atteindre des concentrations constantes indépendamment de la présence de leurs substrats.

Il existe également des **enzymes inductibles** ou **répressibles** dont la synthèse est contrôlée par des molécules appelées inducteur ou represseur.

Une enzyme **inductible** n'existe normalement qu'à l'état de traces dans les cellules bactériennes, sa concentration augmente considérablement lorsque l'on ajoute son substrat au milieu de culture.

L'existence d'un système inductible a été décrit dans le chapitre précédent (p. 239, fig. 10.6), au cours de l'étude de l'opéron lactose chez E. coli.

La synthèse de certaines enzymes est **réprimée** par le produit terminal de la voie métabolique qui réalise sa synthèse. Par exemple, si l'on cultive E. coli sur milieu minimum, contenant l'ammonium (NH_4^+) comme seule source d'azote, la bactérie synthétise toutes les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la totalité des acides aminés. Si l'on ajoute à ce milieu l'histidine, très rapidement les enzymes qui sont responsables de la biosynthèse de cet acide aminé disparaissent de la cellule, il y a eu répression de leur synthèse.

A. L'induction de l'opéron lactose chez E. coli

De la description du mécanisme de l'induction de l'opéron lactose (p. 239, fig. 10.6), on peut retenir les idées moyennes suivantes :

— la régulation de la synthèse des trois protéines de l'opéron lactose est fondée sur la transcription de l'ARN messager ;

— la transcription commence par la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur, l'interaction entre ce site de l'ADN et l'enzyme n'est possible qu'en présence d'un complexe formé entre la protéine CAP et l'AMP cyclique ;

— le gène régulateur I est transcrit, puis traduit en un répresseur actif, protéine qui se complexe au site opérateur ;

— la transcription des gènes de structure *Z*, *Y* et *A* de l'opéron lactose n'est possible que si le site opérateur est vacant ;

— les β-galactosides inducteurs agissent en se combinant au répresseur, le complexe inducteur-répresseur est inactif, incapable de se lier au site opérateur.

B. Une autre modalité de la régulation promoteur-opérateur : la répression de la synthèse enzymatique

La transcription des gènes de structure codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'histidine est contrôlée par un mécanisme voisin de celui de l'opéron lactose chez E. coli (fig. 11.8).

Une différence essentielle cependant, l'histidine joue le rôle de corépresseur, l'introduction d'histidine dans le milieu change la conformation du répresseur protéique, elle transforme la configuration inactive du répresseur en configuration active.

En l'absence d'histidine, le répresseur est inactif, la transcription a lieu, en présence d'histidine (corépresseur) le complexe répresseur-corépresseur actif occupe le site opérateur, la transcription n'a pas lieu.

Les mécanismes élémentaires de régulation qui viennent d'être décrits ont été choisis pour leur simplicité, de nombreux opérons bactériens présentent des mécanismes régulateurs beaucoup plus complexes.

Chez les eucaryotes, l'exploration des mécanismes régulateurs a commencé, ils portent sur la transcription, la transformation post transcriptionnelle de l'ARNm (épissage) et la traduction.

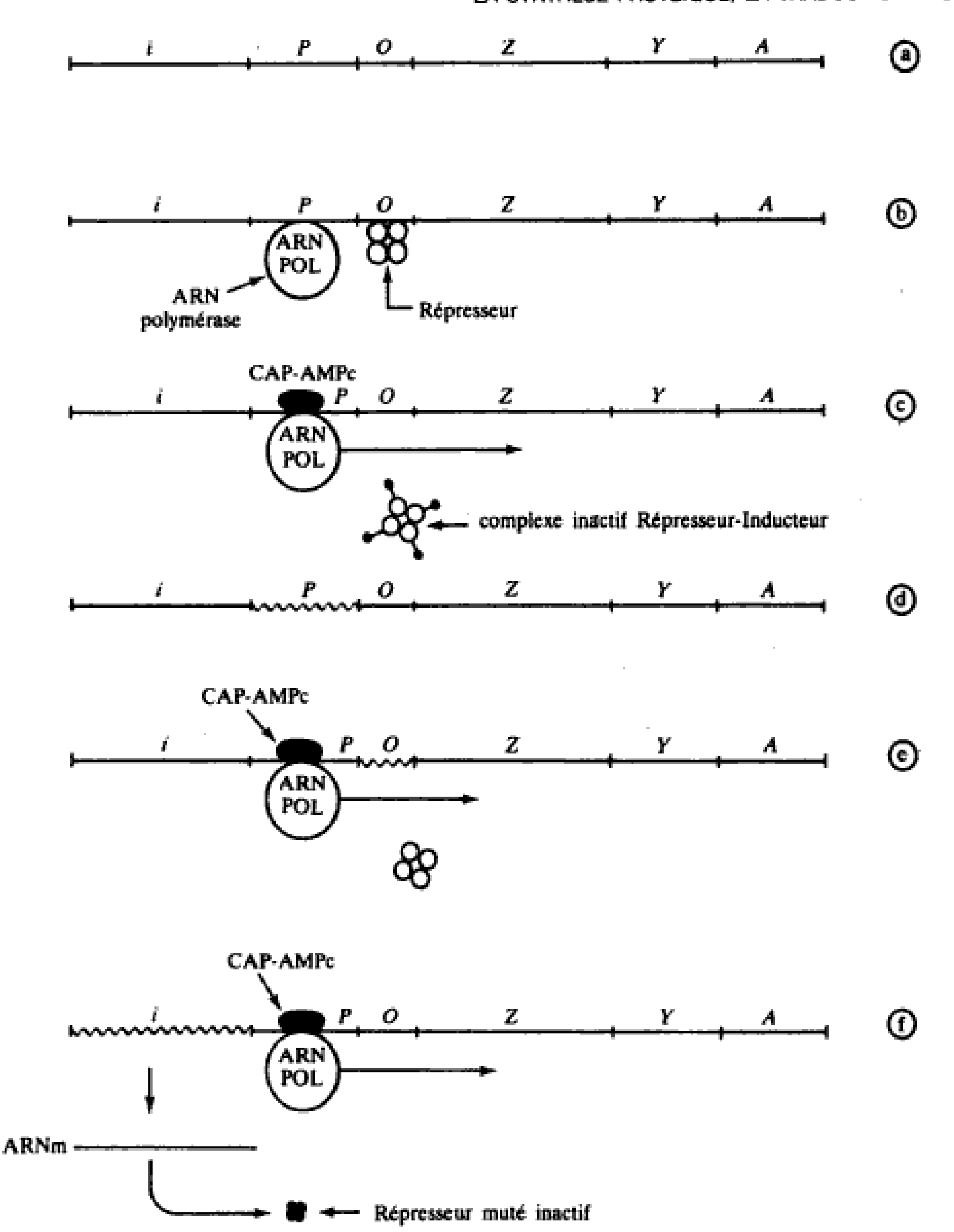


Figure 11.8 Différentes modalités d'expression de l'opéron lactose.

a) l'opéron lactose comprend le gène régulateur *i*, les sites P (promoteur) et O (opérateur) et des gènes de structure *Z*, *Y* et *A* ;

b) la transcription de l'opéron lactose est réprimée, le répresseur produit de l'expression du gène régulateur *i*, occupe le site opérateur ;

c) l'inducteur (β-galactoside) inactive le répresseur, la transcription de l'opéron lactose a lieu ;

d) le site promoteur P est muté, l'ARN polymérase ne se fixe pas, la transcription n'a pas lieu ;

e) le site opérateur O est muté, le répresseur ne se fixe pas, la transcription a lieu ;

f) le gène régulateur *i* est muté, le répresseur synthétisé est inactif, la transcription a lieu.

INDEX ALPHABÉTIQUE

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Biochimie métabolique

La biochimie, chimie du vivant, est à la fois l'étude des structures et celle de leurs transformations dans les cellules, les tissus et les organismes.

Une critique, quelquefois formulée, désapprouve la séparation entre l'étude des biomolécules et celle de leur métabolisme ; cependant, dans un laboratoire de recherche, les tâches correspondant à ces deux fonctions sont parfaitement dissociées.

Cl. Audigié†
F. Zonszain†

Cet ouvrage de niveau relativement élémentaire, de niveau Bac + 2, résume l'ensemble des connaissances qui font partie de la culture de tout biologiste. La démarche pédagogique adoptée par les auteurs permet l'acquisition des concepts fondamentaux sans faire appel à des notions de thermodynamique et de biophysique trop complexes.

Il sera utile à tous les étudiants de biochimie de premier cycle de l'enseignement supérieur (STS, IUT, DEUST...) pour acquérir les connaissances indispensables à l'obtention du diplôme. Il rendra service à tous les biologistes ayant besoin des fondements du métabolisme pour comprendre et expliquer leur science.

Ce livre forme un ensemble complet avec l'ouvrage de *Biochimie structurale,* des mêmes auteurs.

9 782704 007158

ISBN : 2-7040-0715-2